

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Extracção em base aquosa de compostos polares da casca de
Eucalyptus globulus na perspectiva da sua recuperação

Tese de Mestrado

de

Maria Inês Ferreira da Mota

Desenvolvida no âmbito da disciplina de Dissertação

realizado em:

LSRE - FEUP



Com financiamento



Orientadores

Doutora Paula Pinto

Prof. Alírio Rodrigues



Departamento de Engenharia Química

Julho de 2011

*Um sonho pode ser realidade se acreditarmos e
se nos esforçarmos para o concretizar!*

Agradecimentos

É com grande alegria que atinjo mais uma meta do meu percurso de vida profissional e de realização pessoal. Claro que tudo isto não teria sido possível sem a contribuição de algumas pessoas que passo a citar.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores Doutora Paula Pinto e Prof. Alírio Rodrigues pela dedicação e orientação técnica imprescindível para a realização deste trabalho.

Gostaria de realçar a paciência e disponibilidade incondicional da Doutora Paula Pinto que dando-me o seu voto de confiança permitiu o meu desenvolvimento científico e a realização deste trabalho.

À Catarina Novo pela sua amizade e magnífica ajuda dada durante a fase experimental deste trabalho.

Ao Eng. Gabriel Sousa do instituto Raiz pela pronta disponibilidade, passagem de conhecimento e preciosa contribuição para a execução deste projecto.

Agradeço a amizade e ajuda dos meus colegas de laboratório Carina Costa, Mariana Moreira, Mónica Santos, Marta Plaza, João Pedro Lopes e Eduardo Silva. A vossa amizade foi imprescindível para esta minha caminhada.

Também gostaria de referir o meu apreço ao Instituto de Investigação da Floresta e do Papel (RAIZ, Eixo-Aveiro) pela cedência de instalações e a todos os colaboradores pela sua preciosa ajuda. Gostaria de destacar a Eng.^a Sara Fernandes, Eng.^a Sandrina, o Sr. Martins, o Sr. Guedes e o Sr. Sousa Pinto que com paciência e muita sabedoria transmitiram-me os seus conhecimentos e deram o seu precioso contributo.

Agradeço ao Projecto BIIPP pelo financiamento da minha bolsa¹.

Por fim, quero salientar a importância dos meus pais, dos meus amigos e da restante família neste meu percurso. Vocês são a minha inspiração para alcançar os meus sonhos e vontade de querer continuar a minha caminhada de aprendizagem a todos os níveis, pessoal e profissional.

¹ Este trabalho foi realizado no âmbito do Projecto BIIPP nº11551 designado por Biorefinaria Integrada na Indústria da Pasta e Papel, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Programa Operacional Factores de Competitividade (POFC) do Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN).

Resumo

A casca de *Eucalyptus globulus* é um dos principais subprodutos das unidades industriais do sector da pasta e papel representando cerca de 10% do peso da pasta produzida. Esta contém elevados teores de compostos polifenólicos onde se incluem os fenólicos simples (ácido gálico e ácido elágico) ou os taninos (condensados e hidrolisados). Alguns destes compostos manifestam actividade biológica e são bastante atractivos para a cosmética e indústrias alimentar e farmacêutica. Assim, como fonte de produtos de elevado valor acrescentado, a casca deve ser considerada no desenvolvimento do conceito de bio-refinaria aplicada à indústria da pasta e papel.

Este trabalho iniciou-se com a caracterização química sumária da casca tendo-se obtido resultados concordantes com a bibliografia existente e de certa forma semelhante à madeira.

A técnica de planeamento experimental Box-Behnken foi utilizada para o estudo de optimização da extracção de material com elevado teor de compostos fenólicos totais e actividade anti-oxidante da casca de *E. globulus*. As experiências foram realizadas em reactores m/k com controlo de tempo e recirculação de líquido. Foi estudada a influência do tempo (30, 195 e 360 min), da concentração de etanol (0, 40 e 80 %) e da temperatura (25, 82,5 e 140 °C). O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, a actividade anti-oxidante pelo método de FRAP e as proantocianidinas pelo método butanol-ácido.

O máximo de rendimento de extracção previsto foi 21,7% m/m_{casca} para 360 min, 140°C e 0% de etanol; em compostos fenólicos totais este valor representa 2,5% da casca. No entanto, este extracto contém por isso apenas 9% de compostos fenólicos totais demonstrando que a um rendimento total mais elevado não está associado um maior rendimento em compostos fenólicos.

Focando a selectividade de extracção, pode obter-se um extracto contendo cerca de 30% m_{EAG}/m_{extracto} de compostos fenólicos, que representa cerca de 2% da casca, um valor de actividade anti-oxidante 2,08 mmoleEA/g_{extracto} e 14% m_{EEM}/m_{extracto}. As condições encontradas que permitem obter estes parâmetros são: 264 min, 82,5°C e 52% de etanol.

Este trabalho permitiu comprovar o potencial da casca de *E. globulus* como fonte de compostos fenólicos com actividade anti-oxidante que podem ser extraídos em condições moderadas. Considerando uma produção anual de casca de cerca de 45 mil ton (para uma unidade industrial com capacidade para 500 mil toneladas de pasta) pode obter-se cerca de 900 ton de material de origem fenólica com actividade anti-oxidante.

Palavras Chave: Actividade anti-oxidante, Bio-refinaria, Casca de *Eucalyptus globulus*, Compostos fenólicos, Metodologia de Superfície de Resposta.

Abstract

Eucalyptus globulus wood is the main raw material used in Portugal for the production of high quality pulp and paper. Generally speaking, in comparison to its respective wood, bark contains high amounts of polyphenolic components, which include simple phenolics (gallic and ellagic acid), or tannins (condensed or hydrolyzed). Some of these biologically active compounds are very appealing to the cosmetic, nutraceutical and pharmaceutical industry.

Therefore, bark as an abundant pulp mill by-product, should be considered in the development of the concept of biorefinery applied to pulp and paper industry. It should be mentioned that an integrated process to extract high value-added compounds of phenolic nature from bark would not have a detrimental effect on its current use as energy generating material.

Initially bark was chemical characterized and the values obtained were in accordance with the existing literature and somewhat similar to the wood.

A Box-Behnken design was employed to optimize the experimental conditions to obtain a high total phenolic content and antioxidant activity. Batch experiments were performed in m/k digester with time control and liquid recirculation. It was studied the influence of time (30, 195 and 360 min), ethanol concentration (0, 40 and 80 % ethanol) and temperature (25, 82,5 and 140 °C). Total phenolics content were determined according to a modified Folin-Ciocalteu method, antioxidant activity by FRAP assay and proanthocyanidins by butanol-acid method.

The highest extraction yield was 21,7 %w/w_{bark} for 360 min, 140°C and 0% ethanol aqueous mixture, accounting for 2,5% of the total phenolic compounds present in the bark. This extract contains only 9% w_{GAE}/w_{extract} of the total phenolic compounds showing that a higher yield of phenolic compounds is not related to a higher total yield. This means that for these conditions selectivity is low. Focusing on the extraction selectivity it can be possible to obtain an extract with approximately 30% of phenolic compounds (which represents about 2% of bark) and a value of antioxidant activity 2,08 mmol_{AAE}/g_{extract} and 14% w_{MEE}/w_{extracto}. These results were obtained for 264 min, 82,5°C and 52% ethanol.

This work demonstrates the bark potential as a source of phenolic compounds with antioxidant activity which can be extracted in moderate conditions. Considering a 45 000 tons of bark produced annually, it can be obtained about 900 tons of antioxidant phenolic material.

Keywords: Antioxidants, Biorefinary, *Eucalyptus globulus* bark, Polyphenolics, Response Surface Methodology

Notação e Glossário

X_i	Variável independente (polinómio de segundo grau)	
Y_i	Variável dependente (polinómio de segundo grau)	
X_1	Tempo	Min
X_2	Temperatura	°C
X_3	Concentração de etanol	%
Y_1	Rendimento de extracção - Teor de sólidos	%m/m _{casca}
Y_2	Teor de cinzas	%m/m _{casca}
Y_3	Teor de compostos fenólicos totais (rendimento)	%m _{EAG} /m _{casca}
Y_4	Actividade anti-oxidante FRAP (rendimento)	%mmol _{EAA} /m _{casca}
Y_5	Teor de compostos fenólicos totais (selectividade)	%m _{EAG} /m _{extracto}
Y_6	Actividade anti-oxidante FRAP (selectividade)	mmol _{EAA} /g _{extracto}
Y_7	Teor de Proantocianidinas (rendimento)	%m _{EEM} /m _{casca}
Y_8	Teor de Proantocianidinas (selectividade)	%m _{EEM} /m _{extracto}

Lista de Siglas

BBD	Box-Behnken Design
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EAA	Equivalentes de ácido ascórbico
EAE	Equivalentes de ácido elágico
EC	Equivalentes de catequina
EEM	Equivalentes de extracto mimosa
TFC	Compostos fenólicos totais
RSM	Metodologia de Resposta de Superfície
HPAEC/PAD	Cromatografia iónica com detecção amperométrica
GC-FID	Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama
GC-MS	Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projecto.....	1
1.2	Contributos do Trabalho.....	2
1.3	Organização da Tese	2
2	Estado da Arte.....	4
2.1	Composição química da casca de <i>Eucalyptus globulus</i>	4
2.1.1	Extractáveis e compostos inorgânicos	4
2.1.2	Componentes macromoleculares e estrutura	5
2.1.3	Compostos fenólicos.....	6
2.2	Estrutura dos flavonóides, ácidos fenólicos e actividade anti-oxidante.....	9
2.2.1	Breve descrição dos métodos de análise usados.....	12
2.3	Planeamento experimental: modelo Box-Behnken.....	13
2.3.1	Exemplos de aplicações da Metodologia de Resposta de Superfície	15
3	Procedimento experimental.....	19
3.1	Preparação da casca de <i>Eucalyptus globulus</i>	19
3.2	Caracterização química da casca	19
3.2.1	Extractáveis, solubilidades e teor de lenhina.....	19
3.2.2	Análise de açúcares: hidrólise e metanólise	21
3.3	Determinação do teor de compostos fenólicos na casca pelo método de Folin-Ciocalteu	23
3.4	Determinação do poder anti-oxidante de redução do ião ferro (método de FRAP adaptado).....	23
3.5	Determinação do teor relativo de proantocianidinas	24
3.6	Extracções da casca <i>E. globulus</i> nos Reactores MK e aplicação do modelo Box-Behnken	24
3.6.1	Descrição geral	24
3.6.2	Desenho do conjunto de experiências a realizar segundo o modelo BBD	24

4	Resultados experimentais e discussão.....	26
4.1	Composição química da casca de <i>Eucalyptus globulus</i>	26
4.1.1	Análise sumária.....	26
4.1.2	Análise de monossacarídeos: hidrólise ácida convencional e metanólise.....	27
4.1.3	Quantificação de compostos fenólicos totais	32
4.2	Extracções da casca <i>E. globulus</i> nos reactores MK e construção das Superfícies de Resposta	32
4.2.1	Características dos extractos obtidos	33
4.2.2	Construção do modelo matemático e análise ANOVA	36
4.2.3	Superfícies de resposta e pontos óptimos	38
5	Conclusões	46
6	Avaliação do trabalho realizado	48
6.1	Objectivos Realizados.....	48
6.2	Limitações e Trabalho Futuro	48
6.3	Apreciação final	48
	Referências	50
	Anexo 1 Resumo da composição química da madeira de <i>Eucalyptus globulus</i>	54
	Anexo 2 Exemplos de curvas de calibração utilizadas.....	55
	Anexo 3 Análise de açúcares e espectros de massa obtidos para o estudo do extracto da metanólise	56
	Anexo 4 Desenho experimental Box-Behnken	77

Índice de tabelas

<i>Tabela 1 Composição química sumária da casca de Eucalyptus globulus</i>	4
<i>Tabela 2 Dados bibliográficos relativos a parâmetros relacionados com o teor em compostos fenólicos existente na casca de Eucalyptus globulus</i>	8
<i>Tabela 3 Codificação dos níveis de factores a estudar no BBD de 3 variáveis X_1, X_2 e X_3 [65].</i>	14
<i>Tabela 4 Quadro resumo com alguns exemplos de aplicação de planeamento experimental na optimização de compostos polifenólicos</i>	16
<i>Tabela 5 Determinação da solubilidade da casca em água e soluções aquosas</i>	20
<i>Tabela 9 Factores de resposta obtidos para cada açúcar a estimar</i>	22
<i>Tabela 10 Composição do reagente FRAP</i>	23
<i>Tabela 11 Composição química sumária da casca de Eucalyptus globulus estudada</i>	26
<i>Tabela 12 Compostos indicados no cromatograma da figura 7</i>	29
<i>Tabela 13 Teor de compostos fenólicos totais obtido para os extractos em etanol/tolueno, água quente, água fria, NaOH 1% e HCl 1% expressos em equivalentes de ácido gálico</i>	32
<i>Tabela 14 Resultados experimentais obtidos para os teores de sólidos totais, cinzas, fenólicos totais, actividade anti-oxidante FRAP e proantocianidinas segundo a aplicação BBD e para dois ensaios extra</i> 33	
<i>Tabela 15 Resultados experimentais obtidos para os teores de sólidos totais, cinzas, fenólicos totais, actividade anti-oxidante FRAP e proantocianidinas para os ensaios previstos pela aplicação do modelo Box-Behnken e dois ensaios extra</i>	38
<i>Tabela 16 Valores previstos para as condições óptimas propostas pelos modelos matemáticos construídos: Y_5 - teor de compostos fenólicos totais e Y_6 - teor de compostos com actividade antioxidante FRAP</i>	45
<i>Tabela 17 Valores previstos e obtidos experimentalmente para as duas extracções realizadas à temperatura de 45°C, 40% de etanol e tempos 30 min (ensaio 16) e 360 min (Ensaio 17).</i>	45
<i>Tabela 18 Composição química sumária da madeira de E. globulus existente na bibliografia</i>	54
<i>Tabela 19 Composição de açúcares existente na bibliografia para a madeira de E. globulus [88]</i>	54
<i>Tabela 20 Composição média de monossacarídeos e ácidos urónicos presentes na casca de E. globulus, libertados por hidrólise ácida H_2SO_4 e por metanólise ácida com diferentes tempos de reacção</i>	56
<i>Tabela 21 Quadro síntese com os parâmetros determinados para cada modelo construído e o respectivo desvio padrão</i>	78
<i>Tabela 22 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta rendimento total de extracção % m/m_{casca}</i>	80

<i>Tabela 23 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta teor de cinzas % m/m_{casca}.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 24 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta rendimento em compostos fenólicos totais % m_{EAG}/m_{casca}.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabela 25 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta rendimento actividade anti-oxidante FRAP % mmol_{EAA}/g_{casca}.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 26 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta selectividade de extracção de compostos fenólicos totais % m_{EAG}/m_{extracto}</i>	<i>84</i>
<i>Tabela 27 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta selectividade de extracção de compostos com actividade anti-oxidante mmol_{EAA}/g_{extracto}.....</i>	<i>85</i>
<i>Tabela 28 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta selectividade de extracção de proantocianidinas % m_{EEM}/m_{extracto}</i>	<i>86</i>
<i>Tabela 29 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta rendimento de extracção de proantocianidinas % m_{EEM}/m_{casca}.....</i>	<i>87</i>

Índice de figuras

<i>Figura 1</i> Uma possível abordagem à aplicação do conceito Bio-refinaria de materiais florestais integrada na indústria da pasta e papel [1, 5].	2
<i>Figura 2</i> Representação esquemática dos três principais componentes macromoleculares da madeira. A. Celulose; B. Glucuronoxilana de <i>E. globulus</i> [20]; C. Possível fracção de lenhina de folhosa [23].	6
<i>Figura 3</i> Exemplo de alguns compostos fenólicos: (A) ácido gálico; (B) ácido elágico; (C) ácido hexahidroxidifénico (HHDP) (D) catequina; (E) estrutura típica de um elagitanino; (F) estrutura típica de um galotanino (β -1,2,3,4,6-pentagalloyl-O-D-glucose); (G) estrutura típica de uma proantocianidina [24-25].	7
<i>Figura 4</i> Estrutura de alguns flavonóides [48-50]: (A) estrutura base dos flavonóides; (B) catequina; (C) quercetina; (D) kaempferol; (E) miricitina; (F) morina; (G) apigenina; (H) cianidina; (I) naringenina. Os valores sob as estruturas dos flavonóides referem-se à actividade antioxidante expressa em equivalentes Trolox.	10
<i>Figura 5</i> Esquematização gráfica de um planeamento experimental com 3 factores [65]: (a) modelo Box-Behnken e (b) três planeamentos factoriais 2^2 interligados.	14
<i>Figura 6</i> Esquema da sequência de ensaios realizados no trabalho experimental. Os ensaios foram realizados no mínimo em duplicado.	19
<i>Figura 7</i> Cromatograma GC-FID dos produtos da metanólise da casca com tempo de reacção 3 horas. Para a identificação dos picos do cromatograma ver tabela 9.	29
<i>Figura 8</i> Comparação dos rendimentos de monossacarídeos obtidos para diferentes tempos de metanólise ácida, recorrendo a GC-FID.	30
<i>Figura 9</i> Comparação dos rendimentos de monossacarídeos obtidos por diferentes métodos: Hidrólise ácida com H_2SO_4 (análise por HPAEC/PAD) e Metanólise ácida (24 h, procedimento e análise por GC-FID). Comparação dos resultados experimentais com os resultados obtidos pelo autor Vázquez e colaboradores (2008) [7] (O método consiste numa hidrólise ácida com TFA 0,2 M, 1 h a 121°C e uma hidrólise enzimática posterior de 6 h a 30°C).	31
<i>Figura 10</i> Correlação entre a actividade anti-oxidante e o teor de compostos fenólicos totais obtida para os ensaios referentes ao modelo Box-Behnken.	36
<i>Figura 11</i> Representação das superfícies de resposta obtidas para o rendimento de extracção em função dos pares de variáveis independentes: tempo e temperatura para 40% de etanol (A) e para água (B), % de etanol e tempo para $T=82.5^\circ C$ (C) e % de etanol e temperatura para $t=195$ min (D).	39
<i>Figura 12</i> Representação das superfícies de resposta obtidas para o teor em compostos fenólicos totais (A, C, E) e para a actividade anti-oxidante FRAP (B, D, F) por massa de casca em função dos pares de variáveis independentes temperatura e tempo para 40% de etanol- A e B, % de etanol e tempo para $T=82.5^\circ C$ - C e D e % de etanol e temperatura para $t=195$ min -E e F.	40

<i>Figura 13 Representação das superfícies de resposta obtidas para o teor em compostos fenólicos totais (A, C, E) e para a actividade anti-oxidante FRAP (B, D, F) por massa de extracto (selectividade) em função do par de variáveis independentes % de etanol e temperatura para 3 tempos de extracção: 30 min - A e B, 195 min - C e D e 360 min - E e F.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 14 Representação das superfícies de resposta obtidas para o teor em compostos fenólicos totais (A, C, E) e para a actividade anti-oxidante FRAP (B, D, F) por massa de extracto (selectividade) em função do par de variáveis independentes % de etanol e tempo para 3 temperaturas de extracção: 25°C - A e B, 82,5°C - C e D e 140°C - E e F.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 15 Representação das superfícies de resposta obtidas para os valores em proantocianidinas por massa de casca em função do par de variáveis concentração de etanol e da temperatura para 360 min (A); por extracto em função do par de variáveis independentes temperatura e tempo: 40% de etanol (B); e em função da temperatura e % etanol: 30 min (C) e 360 min (D).</i>	<i>44</i>
<i>Figura 16 Exemplo de uma recta de calibração utilizada para a determinação do teor de fenólicos totais.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 17 Exemplo de uma recta de calibração utilizada para a determinação da actividade anti-oxidante de redução do ião ferro (FRAP).</i>	<i>55</i>
<i>Figura 18 Cromatograma em GC-MS da metanólise da casca 4 horas (para tempos de retenção entre 11 min e 14 min, aproximadamente).</i>	<i>57</i>
<i>Figura 19 Sobreposição dos cromatogramas em GC-FID dos padrões arabinose e ramnose metilados (2 horas de metanólise) e sililados.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 20 Espectro de massa para tempo de retenção 11,73 min correspondente a α-arabinofuranosídeo de metilo trimetilsililado.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 21 Ampliação 230 a 360 m/z do espectro relativo a α-arabinofuranosídeo de metilo trimetilsililado (figura 20).</i>	<i>58</i>
<i>Figura 22 Espectro de massa para tempo de retenção 11,80 min correspondente a β-arabinopiranosídeo de metilo trimetilsililado.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 23 Ampliação 230 a 360 m/z do espectro relativo a β-arabinopiranosídeo de metilo trimetilsililado (figura 22).</i>	<i>59</i>
<i>Figura 24 Espectro de massa para tempo de retenção 12,06 min correspondente a α-arabinopiranosídeo de metilo trimetilsililado.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 25 Espectro de massa para tempo de retenção 12,23 min correspondente a α-xilofuranosídeo de metilo trimetilsililado.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 26 Espectro de massa para tempo de retenção 12,34 min correspondente a β-xilofuranosídeo de metilo trimetilsililado.</i>	<i>61</i>
<i>Figura 27 Espectro de massa para tempo de retenção 12,63 min correspondente a α-ramnopiranosídeo de metilo trimetilsililado.</i>	<i>61</i>

Figura 28 Ampliação 230 a 360 m/z do espectro relativo a α -ramnopiranosídeo de metilo trimetilsililado (figura 27).....	62
Figura 29 Espectro de massa para tempo de retenção 12,91 min correspondente a β -arabinofuranosídeo de metilo trimetilsililado.	62
Figura 30 Espectro de massa para tempo de retenção 13,85 min correspondente a derivado de pentose não metilado trimetilsililado.	63
Figura 31 Espectro de massa para tempo de retenção 14,36 min correspondente a α -xilopiranosídeo de metilo trimetilsililado.	63
Figura 32 Espectro de massa para tempo de retenção 14,88 min correspondente a β -xilopiranosídeo de metilo trimetilsililado.	64
Figura 33 Cromatograma em GC-MS da metanólise da casca 4 horas (para tempos de retenção entre 16 min e 21 min, aproximadamente). Na figura indicam-se os tempos de retenção das diferentes formas metiladas do ácido galacturónico.	64
Figura 34 Espectro de massa para tempo de retenção 16,02 min correspondente a derivado de xilose não metilado.	65
Figura 35 Espectro de massa para tempo de retenção 16,95 min correspondente a α -galacturonofuranosídeo de metilo trimetilsililado.	65
Figura 36 Espectro de massa para tempo de retenção 17,79 min correspondente a β -galacturonofuranosídeo de metilo trimetilsililado.	66
Figura 37 Espectro de massa para tempo de retenção 19,35 min correspondente a α -galacturonopiranosídeo de metilo trimetilsililado.	66
Figura 38 Espectro de massa para tempo de retenção 19,53 min correspondente a β -galacturonopiranosídeo de metilo trimetilsililado.	67
Figura 39 Cromatograma em GC-MS da metanólise da casca 4 horas (para tempos de retenção entre 16 min e 21 min, aproximadamente). Na figura indicam-se os tempos de retenção das formas metiladas da glucose.	67
Figura 40 Espectro de massa para tempo de retenção 20,27 min correspondente a α -glucopiranosídeo de metilo trimetilsililado.	68
Figura 41 Espectro de massa para tempo de retenção 20,92 min correspondente a β -glucopiranosídeo de metilo trimetilsililado.	68
Figura 42 Espectro de massa para tempo de retenção 17,49 min correspondente a derivado de xilose não metilado trimetilsililado.	69
Figura 43 Ampliação do cromatograma GC-MS da metanólise da casca 4 horas (para tempos de retenção 16 min e 21 min). Na figura indica-se as formas metiladas de metil(metil α,β -4-O-metil glucopiranosídeo)uronato.	69

Figura 44 Espectro de massa para tempo de retenção 17,12 min correspondente a ácido 4-O-metil-glucurónico metilado trimetilsililado.	70
Figura 45 Ampliação 230 a 360 m/z do espectro relativo ácido 4-O-metil-glucurónico metilado trimetilsililado (figura 44).....	70
Figura 46 Espectro de massa para tempo de retenção 17,33 min correspondente a ácido 4-O-metil-glucurónico metilado trimetilsililado.	71
Figura 47 Ampliação 230 a 360 m/z do espectro relativo ácido 4-O-metil-glucurónico metilado trimetilsililado (figura 46).....	71
Figura 48 Cromatograma em GC-MS da metanólise da casca 4 horas (para tempos de retenção entre 18 min e 20 min, aproximadamente). Na figura indicam-se os tempos de retenção das formas metiladas da manose e galactose.....	72
Figura 49 Espectro de massa para tempo de retenção 18,00 min correspondente a α -manopiranosideo de metilo trimetilsililado.	72
Figura 50 Sobreposição dos cromatograma em GC-FID dos padrões manose e galactose metilados (2 horas de metanólise) e sililados.	73
Figura 51 Espectro de massa para tempo de retenção 18,26 min correspondente a α -galactofuranosideo de metilo trimetilsililado.	73
Figura 52 Espectro de massa para tempo de retenção 18,96 min correspondente a α -galactopiranosideo de metilo trimetilsililado.	74
Figura 53 Espectro de massa para tempo de retenção 19,12 min correspondente a β -galactofuranosideo de metilo trimetilsililado.	74
Figura 54 Espectro de massa para tempo de retenção 19,72 min correspondente a β -galactopiranosideo de metilo trimetilsililado.	75
Figura 55 Cromatograma em GC-MS da metanólise da casca 4 h, 6h e 8 h (para tempos de retenção entre 21 min e 30 min, aproximadamente).....	75
Figura 56 Espectro de massa para tempo de retenção 28,08 min atribuído a um dissacarídeo.	76
Figura 57 Espectro de massa para tempo de retenção 28,42 min atribuído a um dissacarídeo.	76
Figura 58 Reactores MK utilizados nas extracções de casca de <i>Eucalyptus globulus</i> (instalações do instituto RAIZ).	77
Figura 59 Resíduos studentizados para os modelos matemáticos construídos para Y_1 Rendimento de extracção total % m/m_{casca} ; Y_2 Cinzas % m/m_{casca} ; Y_3 Rendimento TFC % m_{EAG}/m_{casca} ; Y_4 Rendimento actividade anti-oxidante FRAP % $mmol_{EAA}/g_{casca}$; Y_5 Selectividade TFC % $m_{EAG}/m_{extracto}$; Y_6 Selectividade actividade antio-oxidante FRAP $mmol_{EAA}/g_{extracto}$; Y_7 Selectividade proantocianidinas % $m_{EEM}/m_{extracto}$; Y_8 Rendimento proantocianidinas % m_{EEM}/m_{casca}	79

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto

Uma bio-refinaria pode ser considerada como uma unidade industrial que integra múltiplos processos de conversão da biomassa para produzir combustíveis, energia, produtos químicos e materiais que se enquadram no binómio baixo volume/elevado valor acrescentado ou elevado volume/baixo valor acrescentado [1]. Estas indústrias são optimizadas no sentido de maximizar a produção de produtos com maior valor acrescentado minimizando simultaneamente os desperdícios através da respectiva conversão em energia/combustíveis [1].

As bio-refinarias podem ser classificadas segundo vários critérios baseando-se nas suas tecnologias de processamento, nas matérias-primas usadas ou no seu desenvolvimento tecnológico [1].

O sector da indústria da pasta e do papel em Portugal tem uma estratégia de exploração sustentável no sentido de diminuir os impactos da desflorestação e ao mesmo tempo tornar o processamento da madeira o mais rentável possível. Nesse sentido surge a implementação do conceito de bio-refinaria no sector com o objectivo de maximizar a rentabilidade dos recursos florestais pela valorização de resíduos resultantes da sua exploração, através da identificação de compostos de valor acrescentado [1].

A figura 1 mostra uma possível abordagem de como pode ser integrada a bio-refinaria num processo produtivo de pasta e papel para a obtenção de bio-energia e bio-produtos, adaptando as suas infra-estruturas produtivas. Desta forma, diversifica-se o tipo de produtos finais mas assegura-se que a principal linha de negócio deste sector não é afectada.

A casca de *Eucalyptus globulus* é um dos resíduos com grande potencial de valorização. Assim, o estudo da composição química e dos processos para a extracção de compostos com elevado valor acrescentado da casca é uma perspectiva emergente de investigação e desenvolvimento, para a qual este projecto pretende ser uma contribuição.

Actualmente a casca de *E. globulus* é utilizada para a obtenção de energia, contudo, esta pode ser ainda mais valorizada através da extracção de compostos com interesse sem inviabilizar a utilização actual da casca.

A casca de *E. globulus* apresenta um grande potencial para a obtenção de compostos fenólicos com actividade anti-oxidante, nomeadamente ácidos fenólicos e flavonóides. A realização de estudos de identificação de novas fontes para estes compostos tem vindo a aumentar na última década de uma forma notória [2]. Foram identificados vários efeitos

biológicos associados aos flavonóides e alguns desses estudos estabelecem associações com a saúde humana [3]. Hollman e Katan (1999) [4] apresentam uma extensa revisão sobre a relação entre o consumo de flavonóides e o seu efeito nas doenças cardiovasculares e cancro.

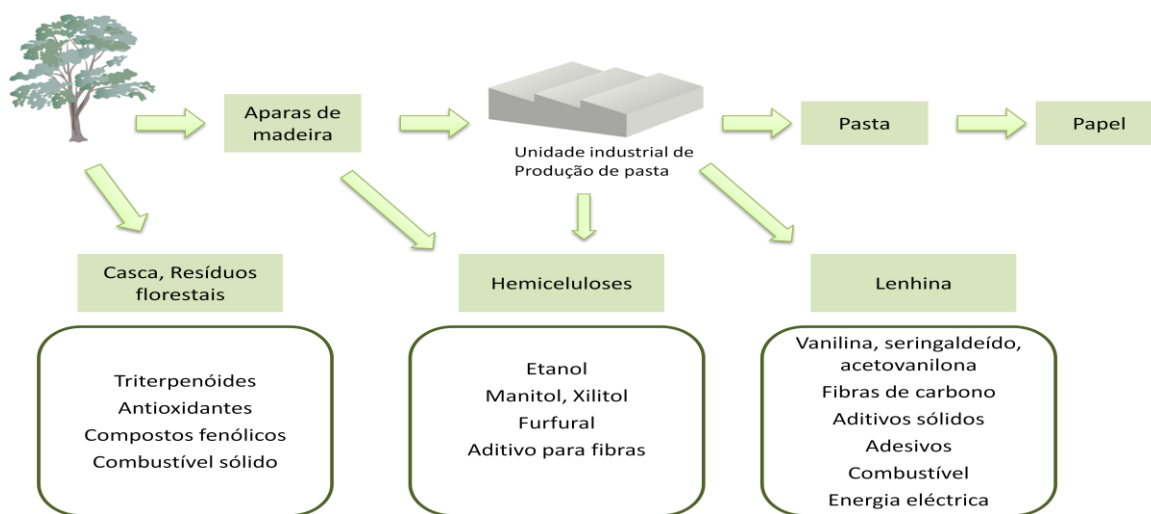


Figura 1 Uma possível abordagem à aplicação do conceito Bio-refinaria de materiais florestais integrada na indústria da pasta e papel [1, 5].

Este trabalho insere-se na perspectiva de valorização deste sub-produto através da obtenção de compostos químicos em particular compostos polifenólicos com actividade anti-oxidante.

Numa primeira fase efectua-se a caracterização química sumária da casca de *E. globulus* e numa segunda fase seleccionam-se as condições favoráveis à extracção de compostos polifenólicos com actividade anti-oxidante.

1.2 Contributos do Trabalho

O presente trabalho dota a indústria da pasta e papel com uma ferramenta para identificar e avaliar vias de valorização da casca, através do aprofundamento do conhecimento da composição química da casca de *E. globulus* e identificação das condições óptimas e correspondentes rendimentos para a extracção de compostos preferenciais.

As empresas poderão assim fazer um melhor aproveitamento dos recursos e consequentemente obter mais benefícios económicos, melhorando a sua competitividade.

1.3 Organização da Tese

Esta tese encontra-se organizada em 6 capítulos:

No **capítulo 1** efectua-se uma breve contextualização do trabalho e apresenta-se os objectivos principais e a organização da tese.

No **capítulo 2** apresenta-se o estado de arte com os principais fundamentos teóricos para a compreensão dos objectivos deste trabalho e bibliografia relevante sobre estudos efectuados com a casca e a madeira de *E. globulus*. Descreve-se de forma sucinta a composição da casca de *E. globulus*; apresenta-se as características dos compostos fenólicos que poderão existir na casca; descrevem-se os principais princípios dos métodos de Folin-Ciocalteu (para a quantificação dos compostos fenólicos totais), análise do poder de redução do ião ferro segundo o método de FRAP (para avaliar a actividade anti-oxidante de um determinado substrato) e ainda do método do butanol-ácido (para avaliação de proantocianidinas); Por fim apresentam-se os conceitos para a implementação do desenho experimental segundo o modelo Box-Behnken e construção de superfícies de resposta.

No **capítulo 3** faz-se uma descrição dos procedimentos e metodologias do trabalho experimental efectuado.

No **capítulo 4** apresentam-se os resultados obtidos e efectua-se a discussão dos mesmos.

No **capítulo 5** são apresentadas as principais conclusões deste trabalho.

No **capítulo 6** faz-se uma auto-avaliação do trabalho desenvolvido com uma apreciação geral dos objectivos atingidos e sugestões para trabalho futuro a desenvolver-se.

Por fim **os Anexos** apresentam os resultados intermédios obtidos e outras considerações importantes e complementares para a compreensão do estudo apresentado.

2 Estado da Arte

2.1 Composição química da casca de *Eucalyptus globulus*

Na casca verificam-se diferenças significativas de composição química conforme a espécie e a região morfológica da casca em estudo. Os constituintes químicos da casca podem ser agrupados em polissacarídeos (celulose, hemicelulose e compostos pécticos), lenhina, compostos polifenólicos (incluem-se os taninos, flavonóides) e extractáveis como ácidos gordos de cadeia longa e respectivos ésteres, fitosteróis, ceras, entre outros [6].

Na tabela 1 apresenta-se um resumo da bibliografia existente para a composição química sumária da casca de *Eucalyptus globulus*. Em anexo, na tabela 15 também se apresenta um resumo da composição química sumária da madeira com o intuito de se estabelecerem algumas comparações.

Tabela 1 Composição química sumária da casca de *Eucalyptus globulus*

Parâmetro	%(m/m) ^(a)				
	Vázquez e colaboradores (2008) [7]	Pereira (1988) [8]	Domingues e colaboradores (2009) [9]	Freire e colaboradores (2002) [10]	Santos e colaboradores (2011) [11]
Teor em Cinzas	4,74	1,61-3,53	-	-	
Extractáveis em:					
Benzeno/Etanol		1,8 - 2,9	-	-	
Diclorometano	-	-	0,9 ^(b)	0,447 ^(c) ; 3,93 ^(d)	
Metanol	2,70	-	-	-	8,24
Etanol	2,48	0,5 - 0,8	-	-	
Solubilidade:					
Água fria	2,59	-	-	-	
Água quente	5,31	-	-	-	
Solução aquosa NaOH 1%	26,58	25,0 - 30,6	-	-	
Lenhina					
Insolúvel (Klason)	16,73 ^(e)	16,7 - 21,1	-	-	
Solúvel	2,48 ^(f)	1,9	-	-	

(a) Os resultados encontram-se expressos em base de casca seca; (b) Tempo de extracção: 7 horas; (c) {casca interna; (d) casca externa (e) De acordo com o procedimento ASTM D1106-96; (f) De acordo com Maekawa e colaboradores (1989) [12].

2.1.1 Extractáveis e compostos inorgânicos

A casca de eucalipto apresenta bolsas de gomas, também designadas por “kino”, e glândulas secretoras de óleos essenciais [13]. Este tipo de gomas são extractáveis hidrofílicos que

englobam na sua composição essencialmente flavonóides e leucocianidinas polimerizadas, por vezes na forma de heterósidos [14]. Na casca de *Eucalyptus globulus* já foram identificados alguns terpenos voláteis [10, 15]. Os componentes de baixo peso molecular na madeira de *E. globulus* também já foram objecto de diversos estudos. Os extractáveis apenas representam uma pequena parte da casca mas consistem numa grande variedade de compostos com baixo peso molecular e facilmente extraíveis com solventes orgânicos. Os extractáveis lipofílicos são um exemplo típico de variação com a zona morfológica da casca. De facto, a região externa da casca apresenta um teor de extractáveis lipofílicos superior à interna, respectivamente 3,93% e 0.447% [10].

Em média, a casca apresenta teores de extractáveis superiores aos da madeira e os teores de polissacarídeos e de lenhina insolúvel são ligeiramente inferiores aos valores apresentados na madeira [8] cuja composição tem sido extensivamente estudada [9, 16].

A fracção de inorgânicos na casca, traduzida pelo teor em cinzas, é composta por cálcio, potássio, magnésio originalmente na forma de carbonatos, silicatos, fosfatos e oxalatos. Em geral, a casca apresenta um teor de cinzas mais elevado do que na madeira [8], tendo a casca interna uma quantidade de cinzas superior à casca externa.

Os compostos fenólicos constituem uma parte significativa dos extractáveis polares na casca de eucalipto. Uma vez que os compostos fenólicos constituem o principal alvo de estudo neste trabalho, na secção 2.1.3. efectua-se uma descrição pormenorizada destes compostos.

2.1.2 Componentes macromoleculares e estrutura

À semelhança da madeira, os componentes estruturais da casca de *E. globulus* são celulose, hemicelulose e lenhina. Em geral, assume-se que os componentes da casca são semelhantes aos componentes da madeira respectiva.

A **celulose** é um polímero linear de cadeia longa e com peso molecular variável. Em geral, o seu grau de polimerização e o seu peso molecular são elevados. É constituída por unidades β -D-glucopirranose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (figura 2.A). A celulose pode encontrar-se ligada com a lenhina, hemicelulose e pectinas. De um modo geral, em *E. globulus* a celulose encontra-se presente na casca interna em maior quantidade do que no seu exterior [17].

As **hemiceluloses** são heteropolissacarídeos com cadeias mais pequenas do que as da celulose apresentando ramificações na cadeia principal. Na casca e madeira, as hemiceluloses são uma mistura complexa de polissacarídeos onde as mais importantes são as glucuronoxilanas (figura 2.B) e glucomananas [18]. Apesar de ainda não existirem estudos relativos às hemiceluloses da casca, considerando dados existentes, assume-se que não serão distintas das de madeira da

mesma espécie. A xilana de *E. globulus* (madeira) apresenta a particularidade de que uma parte dos resíduos 4-*O*-metil- α -D-glucurónico se encontram ligados a galactose [19] e/ou glucose [20]. Foi sugerido que estas ramificações constituem dois pontos de ligação com outros polissacarídeos da parede celular, nomeadamente glucanas e ramnoarabinogalactanas, conforme se ilustra na Figura 2.B [20].

A lenhina (Figura 2.C) é uma macromolécula amorfa e com uma estrutura tridimensional formada por acoplamento oxidativo de unidades do tipo fenilpropano: álcool *p*-cumarílico (sem grupos metoxilo no anel aromático), o álcool coniferílico (possui um grupo metoxilo) e o álcool sinapílico (possui dois grupos metoxilo)[21]. Encontra-se predominantemente na união entre as células vegetais conferindo maior rigidez, impermeabilidade e maior resistência aos ataques microbianos. A lenhina existente na casca apresenta valores mais baixos de grupos metoxilo e quantidades superiores de grupos ácidos do que na madeira [6]. No entanto, salienta-se que esta observação pode ser atribuída ao elevado conteúdo em compostos fenólicos que inevitavelmente são quantificados e/ou isolados como lenhina (dado o carácter semelhante) e cuja presença provoca a diminuição do teor em metoxilos e o aumento do teor em grupos carboxilo determinados no material. De facto, é referido na literatura que a lenhina da casca inclui compostos polifenólicos que, por isso, são quantificados como lenhina [22].

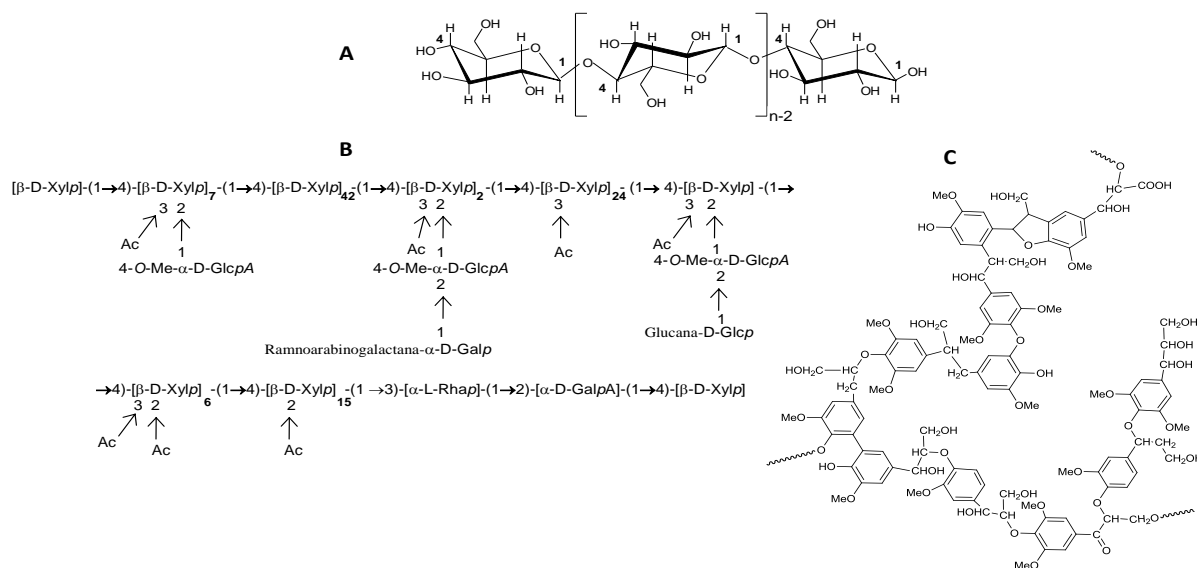


Figura 2 Representação esquemática dos três principais componentes macromoleculares da madeira. A. Celulose; B. Glucuronoxilana de *E. globulus* [20]; C. Possível fracção de lenhina de folhosa [23].

2.1.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos subdividem-se em ácidos fenólicos (figura 3.A, 3.B e 3.C) (e aldeídos correspondentes), flavonóides simples (como a catequina (figura 3.D) e galocatequina,

precursores das proantocianidinas), taninos (figura 3.E, 3.F e 3.G) e compostos polifenólicos não flavonóides (lenhanos e estilbenos). Alguns compostos fenólicos podem-se ligar com monossacarídeos, designando-se assim por glicosídeos.

O grupo dos taninos podem ser divididos em taninos hidrolisáveis (figura 3.E e 3.F) e condensados (figura 3.G). Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos fenólicos e açúcares, em geral glucose e dividem-se em galotaninos (açúcares esterificados com ácido gálico) e elagitaninos (açúcares esterificados com ácido elágico). A hidrólise origina ácido gálico (figura 3.A), ácido elágico (figura 3.B) ou o derivado, o ácido hexahidroxidifénico (figura 3.C) e o respectivo resíduo de monossacarídeo.

Os taninos condensados são também designados por proantocianidinas e são polifenóis constituídos por catequina e leucoantocianidina unidas entre si por ligações carbono-carbono que só em condições especiais são clivadas.

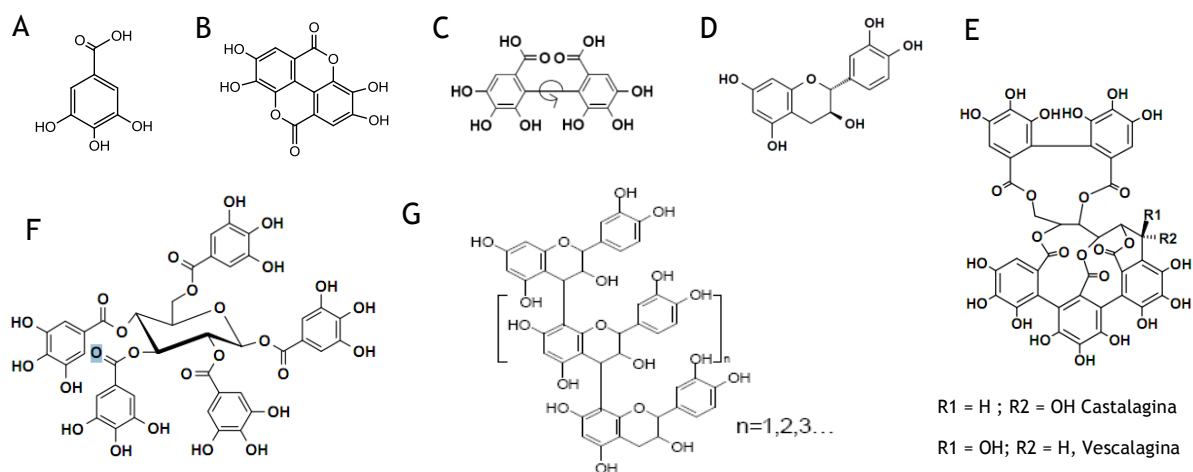


Figura 3 Exemplo de alguns compostos fenólicos: (A) ácido gálico; (B) ácido elágico; (C) ácido hexahidroxidifénico (HHDP) (D) catequina; (E) estrutura típica de um elagitantino; (F) estrutura típica de um galotanino (β -1,2,3,4,6-pentagalloyl-O-D-glucose); (G) estrutura típica de uma proantocianidina [24-25].

Na tabela 2 são apresentados alguns valores conhecidos na bibliografia para vários parâmetros relacionados com o teor em compostos fenólicos na casca de *Eucalyptus globulus*.

Verifica-se que os teores de material extraído compostos fenólicos e actividade antioxidante são equivalentes para os meios extractivos etanol e metanol. No entanto, a introdução de água no meio extractivo em proporção 1:1 com álcool beneficia o rendimento e a selectividade para compostos fenólicos e compostos com actividade anti-oxidante. O rendimento é significativamente aumentado com a introdução de Na_2SO_3 , mas sem benefício na composição do extracto no que se refere a fenólicos totais. A extracção com soluções de NaOH remove mais material da casca (chegando a cerca de 20% para 10% NaOH), no entanto,

o conteúdo em compostos fenólicos e com actividade anti-oxidante nos extractos obtidos diminui significativamente. Os resultados obtidos por Vázquez e colaboradores [7, 26] demonstram claramente que a mistura equivolúmica água: álcool nas condições utilizadas neste trabalho permite obter extractos com aproximadamente 2x mais actividade anti-oxidante do que os extractos em água, etanol, metanol ou soluções de NaOH ou Na₂SO₃.

Tabela 2 Dados bibliográficos relativos a parâmetros relacionados com o teor em compostos fenólicos existente na casca de Eucalyptus globulus

Vázquez e colaboradores 2008 ^A [7]				
	% Extractáveis (m/m)	Teor compostos fenólicos totais		Actividade anti-oxidante mmol _{EAA} /g _{extracto}
		g _{EAG} /100g extracto	g _{EAG} /100g casca	
Etanol	2,48	11,9	0,295	0,483
Metanol	2,70	13,3	0,359	0,490
Água	6,80	18,1	1,231	0,912
Etanol/Água (50:50)	4,99	22,3	1,113	2,146
Metanol/Água (50:50)	5,19	20,1	1,043	2,199
2,5% Na ₂ SO ₃	8,55	18,6	1,590	0,914
Vázquez e colaboradores 2009 ^B [26]				
	% Extractáveis (m/m)	Teor compostos fenólicos totais		Actividade anti-oxidante mmol _{EAA} /g _{extracto}
		g _{EAG} /100g extracto	g _{EAG} /100g casca	
2,5% NaOH, 70°C	9,8	5,43	0,532	0,176
2,5% NaOH, 90°C	10,8	8,77	0,947	0,227
10% NaOH, 70°C	16,4	3,63	0,595	0,162
10% NaOH, 90°C	18,9	5,40	1,021	0,164
Cadahía e colaboradores 1997b ^C [27]				
	Extractáveis (%m/m _{casca})	Teor compostos fenólicos totais %m _{EAG} /m _{casca}	Proantocianidinas %m _{EC} /m _{casca}	Elagitaninos m _{EAE} /m _{casca}
Metanol/Água (80:20)	[4,70 - 7,79]	[1,419 - 2,283]	[0,328-0,743]	[0,54 - 1,10]

Notas: EAG - equivalentes de ácido gálico; EAA - equivalentes de ácido ascórbico; EC - equivalentes de catequina; EAE - equivalentes de ácido elágico. (A) As extracções com etanol e metanol foram realizadas em soxhlet durante 15h. As extracções aquosas de metanol e etanol foram realizadas em refluxo durante 2h para uma razão sólido/líquido 1:15 (m/m). As extracções com água e Na₂SO₃ foram realizadas num reactor de vidro 2-L Pyrex, agitação mecânica e controlo de temperatura. Após atingir-se 90°C as extracções foram realizadas por 1h.

(B) As extracções foram realizadas num reactor de vidro 2-L Pyrex, agitação mecânica e controlo de temperatura. Após atingir-se a temperatura desejada 70 ou 90 °C, as extracções foram realizadas por 1h.

(C) Os compostos fenólicos foram estudados num extracto obtido a partir de uma extracção metanol/água (80:20), à temperatura ambiente durante 24 horas.

Na casca de *E. globulus* foram detectados como compostos fenólicos maioritários elagitaninos e ácido elágico [28]. Foram identificados outros compostos fenólicos de baixo peso molecular

tais como ácido gálico, catequina, galocatequina e diversos tipos de flavonóides [28-29] como eriodictiol, quercetina, naringenina, taxifolina e apigenina [30]. Fechtal e Riedl (1991) [31] identificaram ácido gálico, ácido elágico, ácido xiquímico, pirogalol, ácido hexahidroxidifénico e catequina em hidrolisados ácidos da casca de eucalipto (4 horas a 105°C), indicando que estes compostos se encontram envolvidos em ligações éster ou éter com outros compostos na matriz da casca. Nestes hidrolisados foram também identificados açúcares: glucose, arabinose e ramnose. Foram já isolados e identificados ramnosídeos do ácido metoxielágico com actividade anti-oxidante [32].

Os polifenóis em geral são conhecidos pelas suas propriedades biológicas benéficas em situações patológicas geradas por stress oxidativo como cancro e doenças neurodegenerativas. A sua actividade anti-inflamatória, anti-alérgica, anti-cancerígena, anti-hemorrágica e anti-oxidante têm sido referidas em inúmeras publicações [33-35]. Foi referido que, entre os compostos polifenólicos, os taninos evidenciam melhores propriedades anti-oxidantes do que os compostos fenólicos simples [36]. Harborne e Williams (2000) [3], apresentam uma extensa revisão sobre os avanços de investigação nesta área.

Actualmente existem vários estudos realizados com legumes, frutas, sementes, cascas e madeira, que revelaram a presença de compostos fenólicos com propriedades anti-oxidantes, capacidade de combater doenças cardiovasculares e prevenir o cancro [37-41]. No entanto, o rendimento e a actividade anti-oxidante de extractos naturais estão directamente correlacionados com o tipo de solvente utilizado e com as condições de extracção [7], levando a que comparação directa entre estudos, mesmo referente à mesma espécie e à mesma zona morfológica, não seja possível.

2.2 Estrutura dos flavonóides, ácidos fenólicos e actividade anti-oxidante

Segundo Halliwell e Gutteridge (1990) [42], um anti-oxidante é uma substância que atrasa ou evita a oxidação de determinado substrato, mesmo quando presente em concentrações baixas (comparativamente com o extracto oxidável).

Geralmente assume-se que os anti-oxidantes podem neutralizar a acção dos radicais livres (sobre os lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.), contribuindo para a prevenção de patologias associadas à acção oxidativa destes [43]. Existem na literatura muitos estudos “in vitro” que demonstram o potencial anti-oxidante dos fenólicos como sequestradores directos de radicais em fase aquosa e agentes capazes de melhorar a resistência à oxidação das lipo-proteínas com densidade baixa, envolvidas nas doenças cardiovasculares [44]. Admite-se que parte da capacidade anti-oxidante de muitos frutos seja devida aos flavonóides [45-46] e a

maioria dos compostos fenólicos nos alimentos apresentam um maior poder anti-oxidante do que a vitamina C, vitamina E e β -caroteno [47].

Existe uma grande variedade estrutural no que diz respeito aos flavonóides, partindo de uma estrutura base comum designada como $C_6-C_3-C_6$ (figura 4.A). As principais classes de flavonóides são definidas pela substituição dos anéis: flavanóis (são exemplos a catequina - figura 7.B - e a epicatequina); flavonóis (quercetina - figura 4.C, kaempferol - figura 4.D, miricitina - figura 4.E, e a morina - figura 4.F), flavonas (apigenina - figura 4.G, rutina), antocianidinas (cianidina - figura 4.H) e flavononas (naringenina, figura 4.I).

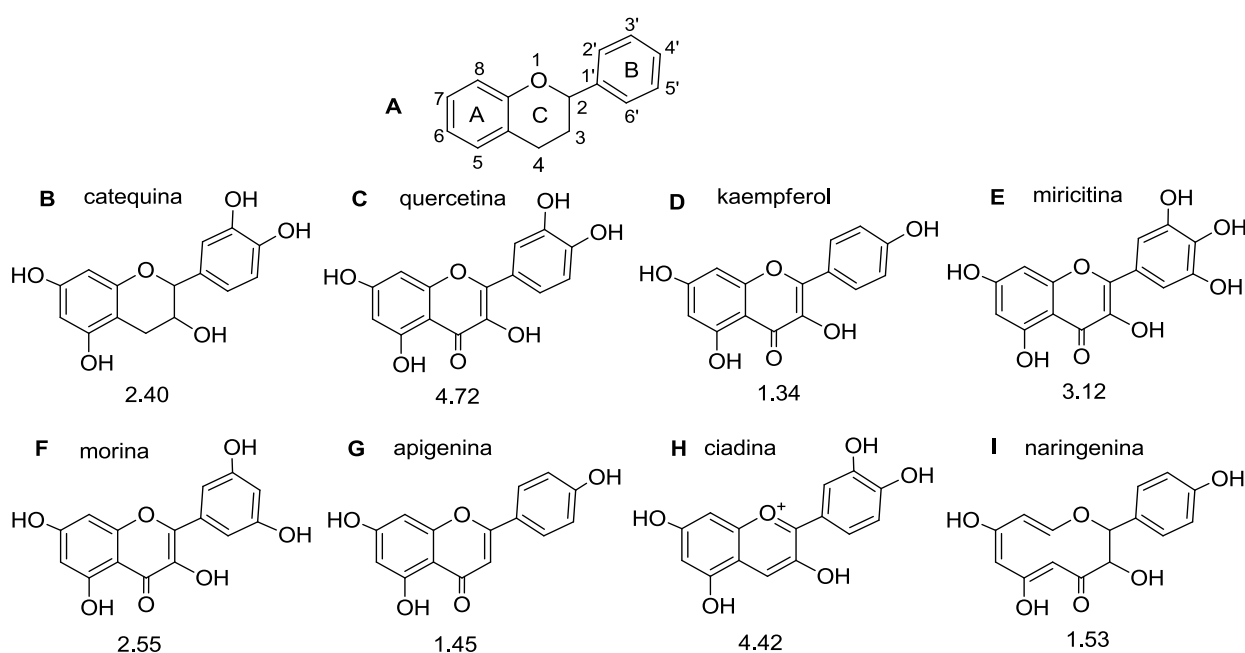


Figura 4 Estrutura de alguns flavonóides [48-50]: (A) estrutura base dos flavonóides; (B) catequina; (C) quercetina; (D) kaempferol; (E) miricitina; (F) morina; (G) apigenina; (H) cianidina; (I) naringenina. Os valores sob as estruturas dos flavonóides referem-se à actividade antioxidante expressa em equivalentes Trolox².

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão assim relacionadas com a actividade anti-oxidante que cada fenol exerce num determinado meio. Por sua vez, a estrutura dos compostos fenólicos determina a acção da molécula como agente redutor [49]. Existem 3 requisitos da estrutura química que favorecem o poder anti-oxidante [49]:

² O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) é um anti-oxidante análogo à vitamina E solúvel em água. No método de TEAC, a actividade anti-oxidante em equivalentes Trolox é definida como a concentração de solução Trolox equivalente a uma concentração 1mM do composto a estudar. Na reacção com anti-oxidantes o radical catião ABTS⁺ (que resulta da adição do sal Na₂S₂O₈ (persulfato de sódio) a ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) é reduzido para a sua forma neutra incolor. A reacção é traduzida pela diminuição de cor a 734 nm.

- Existência de grupos hidroxilo no anel B nas posições 3' e 4', que contribuem para a deslocalização dos electrões conferindo uma maior estabilidade à forma radicalar [49, 51];
- Existência de uma ligação dupla C2,3 conjugada com grupo carbonilo no C4 no anel C que aumenta a deslocação electrónica a partir do anel B.
- Existência de grupos hidroxilo nas posições 3 (anel C) e 5 (anel A) com grupo carbonilo no C4 (anel C);

Pela figura 4, ao estabelecer-se uma comparação entre a actividade anti-oxidante expressa em equivalentes Trolox e a estrutura dos compostos quercetina, catequina e cianidina verifica-se que as ligações duplas conjugadas favorecem a actividade anti-oxidante, que se deve à estabilidade conferida pelas estruturas de ressonância [49].

O grupo hidroxilo localizado num dos carbonos (C3) de uma ligação dupla (C2,3) parece também favorecer a actividade anti-oxidante [52], assim como a presença de grupos OH vicinais no anel B (grupo catecol) [49].

Os flavonóides quercetina, kaempferol, miricitina e morina (figura 4) apresentam uma estrutura base semelhante que difere apenas no número e disposição dos grupos hidroxilo no anel B. A comparação entre as estruturas do kaempferol e quercetina demonstra que o 2º grupo hidroxilo em C3' exerce uma grande influência na actividade anti-oxidante que se traduz num valor cerca de 3,5 vezes maior no segundo. A comparação com a estrutura e actividade anti-oxidante da catequina demonstra que a ligação dupla 2,3 e o grupo carbonilo são importantes para a actividade anti-oxidante já que a quercetina apresenta o dobro do valor em equivalentes trolox da catequina. A presença de um terceiro grupo hidroxilo no anel B (em C5') não melhora significativamente a actividade anti-oxidante (miricitina e quercetina).

Pode-se concluir que a actividade anti-oxidante de um flavonóide é marcadamente influenciada pelo anel B devido à sua maior capacidade de doar electrões. Os ácidos mono-hidroxi-benzóicos são anti-oxidantes fracos devido a presença de um simples grupo carboxílico, que influencia negativamente a capacidade da molécula doar protões H.

A actividade anti-oxidante aumenta consideravelmente dos ácidos mono-hidroxibenzóicos para os ácidos di-hidroxibenzóicos e a posição dos grupos hidroxilo determina a resposta anti-oxidante. Em relação ao grupo de ácidos hidroxibenzóicos, o ácido gálico é o que apresenta uma maior capacidade anti-oxidante [49]. A introdução de um grupo etilo entre o anel aromático e o grupo carboxilo favorece positivamente as propriedades redutoras do grupo hidroxilo. Em concordância com este facto, a actividade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos é maior que a dos ácidos hidroxibenzóicos.

2.2.1 Breve descrição dos métodos de análise usados

A capacidade (ou poder) anti-oxidante dos compostos fenólicos pode ser avaliada por diversos métodos. Huang e colaboradores 2005 [53], apresenta uma extensa revisão dos principais métodos para análise da actividade anti-oxidante onde expõe os aspectos multi-facetados dos compostos anti-oxidantes e descreve os principais métodos existentes para avaliar a capacidade anti-oxidante e quais as suas diferenças, vantagens e limitações. É importante referir que dado à especificidade de cada método existente pode ser necessário aplicar mais que um método de quantificação da actividade anti-oxidante [49, 53-54]

O método de Folin-Ciocalteu (FC) foi inicialmente aplicado para a análise de proteínas e posteriormente adaptado [55] para a quantificação de compostos fenólicos totais nos vinhos. Actualmente este método é bastante aplicado para a quantificação de compostos fenólicos totais numa variedade de substratos. Este método mede a capacidade de redução de uma determinada amostra e apresenta uma boa correlação linear com os métodos de quantificação da actividade anti-oxidante tais como o método de FRAP, dada a similaridade dos princípios químicos de ambos os métodos.

Este método apresenta como limitação o facto de não ser específico para compostos fenólicos podendo o reagente de Folin-Ciocalteu ser reduzido com outras substâncias não fenólicas tais como a vitamina C e Cu(I). Existe um método enzimático para a quantificação de compostos fenólicos que é mais específico e baseia-se na utilização de uma polifenol oxidase [56]. No entanto, o método Folin-Ciocalteu apresenta a grande vantagem de ser bastante fácil de executar e apresentar resultados reprodutíveis e, por esta razão, este é ainda muito utilizado para a quantificação de compostos fenólicos totais.

O reagente de FC consiste numa mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato, apresenta cor amarela intensa e na reacção de redução adquire uma cor azulada, cuja intensidade da cor depende da extensão da reacção. A dissociação do OH fenólico dá origem ao anião fenolato que por sua vez é capaz de reduzir o reagente FC cuja cor azul obtida é causada pela espécie aniónica $(PMOW_{11}O_{40})^{4-}$. Isto suporta o pressuposto de que a reacção ocorre através de um mecanismo de transferência de electrões.

O método FRAP ou poder anti-oxidante de redução do ião ferro, à semelhança do método de Folin-Ciocalteu, também se baseia em reacções de transferência de electrões. Neste método um sal de um complexo de ferro, $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$ ³ é utilizado como um oxidante [57]. Neste método a reacção ocorre em meio ácido ($pH \cong 3,6$) e a absorvância a 593 nm é utilizada

³ TPTZ = 2,4,6 – tripyridyl-s-triazine

para a quantificação de compostos com actividade anti-oxidante. Para a calibração é, geralmente, utilizado ácido ascórbico.

O método do butanol-HCl [25] é um método para a quantificação de proantocianidinas. Neste método as subunidades das proantocianidinas são clivadas dando origem a antocianidinas que apresentam uma cor vermelha em meio ácido. A cor resultante pode ser quantificada espectrofotometricamente a 550 nm. Convém salientar que o desenvolvimento da cor depende do solvente utilizado e é reduzida pela presença de água. Por essa razão as condições de reacção devem ser rigorosamente controladas.

As características químicas dos taninos como a ligação interflavonóide e o padrão de oxigenação também afectam significativamente o rendimento da cor. Por vezes a quantificação de proantocianidinas pode ser subvalorizada pelo facto de algumas proantocianidinas serem insolúveis no solvente de reacção [58].

Segundo Hagerman e colaboradores (1998) [36] os taninos condensados (ou proantocianidinas) e taninos hidrolisáveis apresentam uma capacidade anti-oxidante maior do que os compostos fenólicos monoméricos. Assim, torna-se essencial conhecer o teor de taninos nos extractos obtidos.

2.3 Planeamento experimental: modelo Box-Behnken

A Metodologia de Superfícies de Resposta [59] [60] é uma técnica de planeamento experimental implementada por Box e Wilson na década de 1950 [61]. É uma metodologia muito utilizada para a criação de um novo produto, melhoramento de um produto ou optimização de um processo produtivo [62].

A abordagem tradicional na selecção do conjunto de condições que optimizam determinado processo consiste em estudar o efeito de uma variável de cada vez. Este tipo de análise é muito limitativo, uma vez que a variação sequencial das variáveis não revela o efeito de interacção entre estas, não é possível distinguir o efeito da variação aleatória dos efeitos reais, não é possível efectuar-se uma previsão para uma experiência não realizada. Outra grande desvantagem é não ser possível estabelecer o número de experiências necessárias para atingir o objectivo pretendido, podendo tornar-se um processo muito moroso e com custos elevados.

A inovação introduzida pela RSM é a de permitir a avaliação dos efeitos individuais e de interacção de todas as variáveis em estudo de forma independente, com base em modelos matemáticos e na variação sistemática das variáveis em estudo. A aplicação de RSM, ao invés da abordagem tradicional, apresenta vantagens nomeadamente, a redução do número de

experiências e do trabalho laboratorial e um consequente menor consumo de reagentes, traduzindo-se numa diminuição significativa dos custos associados e mão-de-obra.

Actualmente, as principais técnicas utilizadas em planeamento experimental para processos de optimização são **compósito central (CCD)**, **Box-Behnken (BBD)** e **Doehlert (DM)** [60, 63-64]. Antes da aplicação de metodologias de optimização com multivariáveis, pode ser efectuada uma triagem inicial recorrendo aos planeamentos experimentais **factorial total** e **factorial fraccionado**. Esta triagem inicial permite conhecer as variáveis com efeitos mais significativos no sistema e estabelecer a região adequada de optimização.

O conceito do modelo BBD pode ser explicado da seguinte forma: imaginando um cubo onde os vértices correspondem ao limite máximo e mínimo das variáveis a estudar, o modelo BBD consiste em estudar o ponto central do cubo e o ponto médio dos extremos da região a estudar (figura 5.a). Este modelo assemelha-se a três planeamentos factoriais 2^2 interligados e com a determinação de um ponto central (figura 5.b).

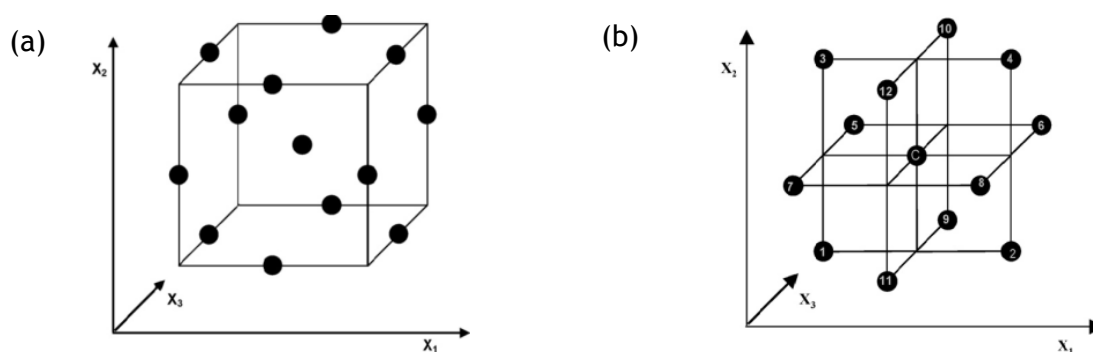


Figura 5 Esquematização gráfica de um planeamento experimental com 3 factores [65]: (a) modelo Box-Behnken e (b) três planeamentos factoriais 2^2 interligados.

Uma vez que neste trabalho o modelo BBD foi aplicado para o estudo de 3 factores, na tabela 3 apresenta-se a combinação de experiências necessárias a realizar neste caso. Realça-se o facto de que esta metodologia permite a utilização mais factores.

Tabela 3 Codificação dos níveis de factores a estudar no BBD de 3 variáveis X_1 , X_2 e X_3 [65].

Ensaio	X_1	X_2	X_3	Ensaio	X_1	X_2	X_3	Ensaio	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0	6	1	0	-1	11	0	-1	1
2	1	-1	0	7	-1	0	1	12	0	1	1
3	-1	1	0	8	1	0	1	C_0	0	0	0
4	1	1	0	9	0	-1	-1	C_0	0	0	0
5	-1	0	-1	10	0	1	-1	C_0	0	0	0

Nota: C_0 - ponto central

Por vezes, o estudo das respostas obtidas para as condições extremas pode não traduzir convenientemente o cenário em estudo. O modelo BBD apresenta a vantagem de evitar a realização de experiências nessas condições extremas, uma vez que as combinações propostas pelo modelo não consideram o estudo dos factores nos seus limites mais altos e mais baixos em simultâneo. Por outro lado, quando se pretende um modelo que inclua a contribuição das condições extremas, o modelo BBD não pode ser aplicado.

A superfície de resposta pode ser representada pela seguinte equação $y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k)$ (1).

Onde y corresponde à resposta do sistema e x_k à variável de entrada em estudo (ou factor). O objectivo de aplicação de RSM no presente trabalho é otimizar a variável de resposta y , encontrando o melhor ajuste entre estas variáveis e a superfície de resposta. Neste estudo, e na generalidade dos estudos de RSM, utiliza-se um ajuste a um modelo de segunda ordem

$$(quadrático): Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (2)$$

Em que, x_1, x_2, \dots, x_k corresponde às variáveis de entrada (factores) que influenciam a resposta y ; β_0, β_{ii} ($i=1, 2, \dots, k$), β_{ij} ($i=1, 2, \dots, k; j=1, 2, \dots, k$) corresponde aos parâmetros desconhecidos e ε ao erro aleatório.

2.3.1 Exemplos de aplicações da Metodologia de Resposta de Superfície

Na natureza existem inúmeros compostos fenólicos diferenciados pela estrutura e propriedades físico-químicas. Como tal, não existe um protocolo para a extracção destes compostos e assim os estudos de optimização devem ser conduzidos tendo em atenção o material de partida e o tipo de compostos que se pretende obter [66-67]. O tipo de solvente utilizado, o pH, a temperatura, o número de etapas, a razão sólido:líquido, tamanho das partículas e a forma da matriz da planta [68] são alguns dos factores que podem influenciar uma extracção. No âmbito de optimização do rendimento de extracção de compostos fenólicos, a aplicação de metodologias de superfície de resposta é muito extensa numa diversidade de matérias-primas como por exemplo casca de madeira [69-70], frutos [71-77], partes de plantas [78-79], frutos secos [80-81]. Na tabela 4 apresenta-se alguns estudos de aplicação de planeamento experimental [59] na optimização de extracção de compostos polifenólicos.

Tabela 4 Quadro resumo com alguns exemplos de aplicação de planeamento experimental na optimização de compostos polifenólicos

Aplicação	Modelo utilizado	Referência
Extracção de compostos fenólicos a partir da casca de <i>Acacia mangium</i> com uma solução Etanol:água 1:1	CCD 3 factores e ajuste polinomial de segunda ordem.	Zhang e colaboradores (2010) [82]
Estudo dos seguintes factores: temperatura (T, 25-50 °C), tempo (t, 30-90 min), e razão líquido:sólido (5 a 10). O solvente utilizado em todos os ensaios foi 50% etanol/água. Modelos obtidos para um intervalo de confiança de 95%. Y ₁ - teor de fenólicos totais expresso em equivalentes de ácido gálico, Y ₂ - actividade anti-radicaais livres expressa em % de inibição, Y ₃ -valor de FRAP expresso para uma absorvância de 593nm.		
$Y_1 = 25,44 - 3,28T - 4,32V + 3,22T^2 + 4,37V^2, R^2_{ajustado}=0,742$		
$Y_2 = 57,23 + 5,84T - 10,18V + 8,20T^2 + 11,017V^2, R^2_{ajustado}=0,774$		
$Y_3 = 1,19 + 0,11t - 0,17T + 0,27V + 0,16T^2 + 0,20V^2, R^2_{ajustado}=0,823$		
O ponto óptimo foi determinado em simultâneo para as 3 respostas obtidas utilizando a análise de resposta múltipla ⁴ : T 50 °C, t 90 min e V 5:1.		
Optimização da extracção de compostos fenólicos com actividade antioxidante com Na₂SO₃ e NaOH na casca de <i>E. globulus</i>	Planeamento factorial total 2 ³ e ajuste polinomial de 2ª ordem	Vázquez e colaboradores (2011) [83]
Estudo dos seguintes factores: x ₁ - Temperatura (90-95-100°C), x ₂ - Concentração de Na ₂ SO ₃ (1,5-3,0-4,5%), x ₃ - Concentração de NaOH (0,0-1,5-3,0%). A razão sólido-líquido utilizada é de 1/15 (m/m) e o tempo de extracção 1 hora. Modelos obtidos para um intervalo de confiança de 90% (Y ₁ - rendimento de extracção expresso em massa base seca, Y ₂ -teor em compostos fenólicos totais, Y ₃ - actividade FRAP, Y ₄ - número-médio do peso molecular Mn e Y ₅ - massa média do peso molecular Mw).		
$Y_1 = 12,959 + 5,271x_3 - 1,739x_2x_3, R^2=0,855$		
$Y_2 = 14,740 - 1,083x_2 - 4,658x_3 - 1,043x_1x_2 + 1,243x_2x_3 - 0,918x_1x_2x_3, R^2=0,997$		
$Y_3 = 812,73 - 370,13x_3 - 73,38x_1x_2 - 71,38x_1x_2x_3, R^2=0,950$		
$Y_4 = 555,82 - 22,13x_1 - 24,13x_3 - 39,63x_2x_3 - 30,13x_1x_2x_3, R^2=0,951$		
$Y_5 = 955,27 - 65,00x_1 + 116,50x_3 - 142,50x_2x_3 - 82,50x_1x_2x_3, R^2=0,932$		
O rendimento de extracção é expresso em massa de casca base seca; o teor de compostos fenólicos é determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e os resultados são expressos em equivalentes de ácido gálico por 100g de extracto; A actividade antioxidante é determinada pelo método de FRAP e os resultados são expressos em nmol de equivalentes de ácido ascórbico por mg de extracto; Número médio e massa média do peso molecular. Os resultados obtidos demonstram boa correlação linear entre o teor de compostos fenólicos totais e a actividade antioxidante (R ² = 0,8915). Demonstra que, de um modo geral, os extractos com baixo peso molecular possuem uma elevada actividade antioxidante FRAP.		
Os valores mais elevados de fenólicos totais e actividade antioxidante (respectivamente 21,9% m _{EAG} /m _{extracto} e 1,328 mmol _{EAA} /g _{extracto}) foram obtidos para as seguintes condições experimentais: 100°C e 1,5% de Na ₂ SO ₃ .		

⁴ Metodologia que permite obter uma única solução num estudo de optimização de várias variáveis dependentes em simultâneo.

Tabela 4 Quadro resumo com alguns exemplos de aplicação de planeamento experimental na optimização de compostos polifenólicos (continuação)

Aplicação	Modelo utilizado	Referência
Extracção de compostos fenólicos com etanol a partir da casca de <i>Phyllanthus emblica</i> L.	CCD 4 factores e ajuste polinomial de 2ª ordem	Yang e colaboradores (2009) [84]
<p>Estudo dos seguintes factores: concentração de etanol (C, 40-80%), tempo (t, 20-40 min), temperatura (T, 30-50°C), número de extracções (N, 1-3 repetições/ciclos.).</p> <p>Modelos obtidos para um intervalo de confiança de 95% (Y - %, rendimento de extracção de fenólicos)</p> $Y = 19,65 - 0,085C - 0,24t + 0,057T + 0,53N + 0,12Ct + 0,14CT + 0,16CN - 0,050tT - 0,46tN + 0,13TN - 0,31C^2 - 0,29t^2 - 0,30T^2 - 0,40N^2$ <p style="text-align: right;">, R²=0,8368</p> <p>O modelo obtido apresenta um valor de significância de 0,0071 e a falta de ajuste de 0,0970. As seguintes variáveis lineares, de interacção e quadráticas são não significantes para o modelo proposto (C, T, Ct, CT, CN, tT, TN, C², t², T²). Para o modelo proposto o número de repetições da extracção (N) é muito significativo.</p> <p>Ponto óptimo previsto: Y= 20,02% (74,63% etanol; 23,16 min; 45,99°C e 2,95 repetições). Ponto óptimo experimental Y=19,78% (75% etanol; 25 min; 45°C e 3 repetições).</p> <p>O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método azul-da-prússia, expresso em µgEAG/mL.</p>		
Extracção de taninos com soluções aquosas de acetona e etanol a partir da casca de <i>Pinus caribaea</i>	CCRD ⁵ 4 factores e ajuste polinomial de 2ª ordem	Derkyi e colaboradores (2011a) [85]
<p>Estudo do rendimento em taninos obtido e influência dos seguintes factores: temperatura de extracção (T, 40-60°C (acetona) e 40-80°C (etanol)), tempo de extracção (t, 30-150 min), concentração de solvente (C, acetona ou etanol 20-100%) e razão líquido-sólido (V, 10:1 a 30:1)</p> <p>Modelos obtidos para a extracção de taninos (Y, resposta prevista pelo modelo):</p> $Y_{acetona} = 1,64 + 0,03T + 0,02t + 0,52V + 0,01TV - 0,009T^2, R^2 = 0,6662$ $Y_{etanol} = 115,16 + 4,58T + 2,42t + 0,58C + 3,25Vt - 3,73T^2, R^2 = 0,8189$ <p>Conjunto de condições óptimas previstas pelos modelos e obtidas experimentalmente:</p> <p>Y_{máx} (Acetona) = 17,57% (previsto) e 14,62% (experimental) - para T 58°C; t 78,5 min, C 60% acetona e V 29,8:1; Açúcares totais 4,4% (previsto) e 4,25% (experimental); Stiasny number 76,96% (previsto) e 90,20% (experimental). Os autores não apresentam o modelo usado para açúcares totais.</p> <p>Y_{máx} (Etanol) = 20,68% (previsto) e 14,62% (experimental) - para T 72°C; t 79,2 min, C 21,9% etanol e V 26,4:1; Os valores de açúcares totais e Stiasny number previstos são 4,94% e 80,47%, respectivamente.</p> <p>O teor de taninos foi determinado pelo método de pó de pele cromado; os taninos condensados pelo método Stiasny Number, o teor de açúcares totais pelo método do fenol/ácido sulfúrico. Os resultados são expressos em percentagem em massa e base de casca seca.</p>		

⁵ CCRD - Central Composite Rotable Design

Tabela 4 Quadro resumo com alguns exemplos de aplicação de planeamento experimental na optimização de compostos polifenólicos (continuação)

Aplicação	Modelo utilizado	Referência
Extracção de taninos condensados da casca de <i>Pinus caribaea</i> com água ou solução de NaOH	CCRD 4 factores (solvente NaOH) e 3 factores (solvente água) e ajuste polinomial de 2ª ordem	Derkyi e colaboradores (2011b) [69]

Estudo dos seguintes factores na extracção de taninos condensados: temperatura (T, 40-100 °C), tempo (t, 15 - 150 min), concentração de solvente NaOH (C, 0,05-1,5%) e razão líquido:sólido (10:1 a 30:1). Modelos obtidos para intervalo de confiança 95%:

$$Y_{NaOH} = 144,74 - 1,86T - 0,02t + 2,62C - 0,47Ct + 0,01T^2, R^2=0,71$$

$$Y_{água} = 92,18 + 0,54T + 2,63t + 1,63V - 8,02T^2 - 4,11V^2, R^2=0,64$$

$Y_{máx, NaOH} = 80\%$ (previsão do modelo) e 74,95% (obtido experimentalmente) - T 46,9°C, t 36 min, C(NaOH) 0,06% e V 22,5:1; Açúcares totais e rendimento em taninos determinados 19,82% e 28,45%, respectivamente.

$Y_{máx, água} = 94,91\%$ (previsão do modelo) e 88,28% (obtido experimentalmente) - T 72,5°C, t 150 min e V 20,8:1; Açúcares totais (3%) e rendimento em taninos (9,74%).

A maioria do material fenólico extraído com água é condensável com formaldeído. O baixo teor de taninos extraídos pela água pode dever-se ao facto da água dissolver preferencialmente compostos polifenólicos de baixo peso molecular; A solução de NaOH para além de extrair compostos fenólicos também extrai outros compostos tais como açúcares e hidratos de carbono; Os métodos experimentais usados são os mesmos descritos em Derkyi e colaboradores (2011a) [85].

Extracção de compostos fenólicos e taninos condensados a partir da casca de <i>Bridelia grandis</i> com metanol e 70% acetona	Planeamento factorial total 2 ³ e ajuste polinomial de 2ª ordem	Brusotti e colaboradores (2010) [86]
---	--	--------------------------------------

Factores estudados: x_1 - Tipo de solvente (metanol ou solução aquosa de acetona 70%), x_2 - método de extracção (Centrifugação ou Ultrasons), x_3 - intervalo de tempo deixado entre a extracção e a pré-concentração antes da análise do teor de fenólicos e taninos condensados (0 e 24h). A razão sólido-líquido utilizada é de 1g/80mL. Modelos obtidos para um intervalo de confiança de 95% (TF - teor em fenólicos totais e TC - teor em taninos condensados).

$$Y_{TF} = 7,15 + 0,80x_1 + 0,78x_2 - 0,07x_3 + 0,09x_1x_2 - 0,12x_1x_3 + 0,34x_2x_3, R^2=0,839$$

$$Y_{TC} = 10,24 + 0,49x_1 + 1,48x_2 - 0,35x_3 + 0,45x_1x_2 - 0,01x_1x_3 + 0,44x_2x_3, R^2=0,894$$

Conclui-se que o melhor solvente é o metanol e o melhor método de extracção é por centrifugação (1 ciclo de 15 min). A estabilidade dos extractos não se altera significativamente para 1 ou 24 horas. Prevê-se um valor máximo de fenólicos totais de 12,7% (12,56%-experimental) e de taninos condensados de 8,8% (8,77%-experimental).

O teor de fenólicos total foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (equivalentes de ácido gálico) e o teor de taninos condensados pelo método do butanol-HCl (equivalentes de delfinidina).

3 Procedimento experimental

3.1 Preparação da casca de *Eucalyptus globulus*

A casca de madeira de *E. globulus* foi seca ao ar e preparada para análise de acordo com a norma TAPPI T257 cm-85 no Instituto RAIZ, em Aveiro. A casca foi moída e posteriormente crivada obtendo-se diferentes fracções de granulometria: a fracção 40-60 mesh foi utilizada para a preparação da casca livre de extractáveis e posterior caracterização química. A fracção 20-40 mesh foi utilizada para as extracções sequenciais com diclorometano e metanol. As determinações indicadas a seguir foram realizadas em duplicado.

3.2 Caracterização química da casca

A figura 6 resume os parâmetros quantificados e a sequência utilizada neste trabalho. A matéria-prima foi gentilmente cedida pela fábrica de Cacia do grupo Portucel Soporcel.

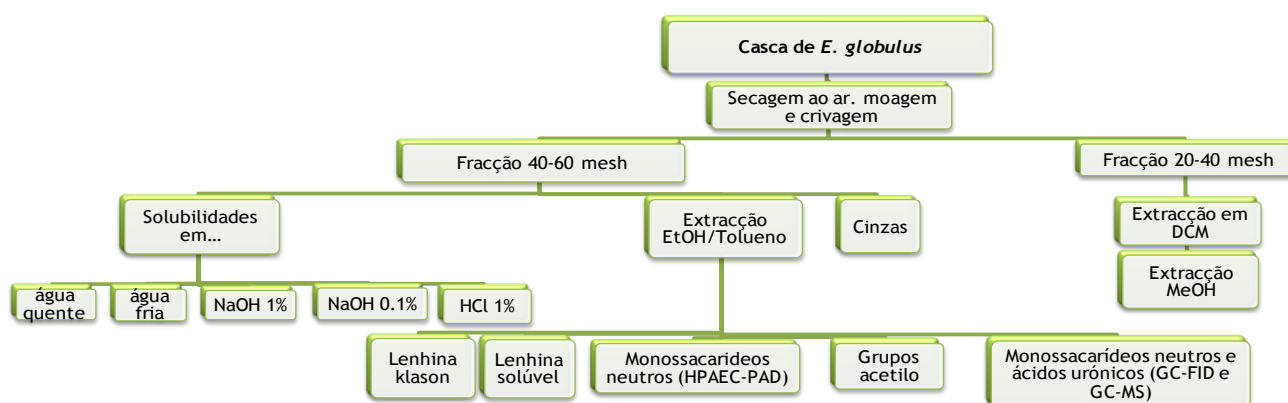


Figura 6 Esquema da sequência de ensaios realizados no trabalho experimental. Os ensaios foram realizados no mínimo em duplicado.

3.2.1 Extractáveis, solubilidades e teor de lenhina

Remoção dos extractáveis da casca com uma solução de etanol/tolueno (1:2) V/V

A casca foi submetida a uma extracção de etanol/tolueno segundo a norma TAPPI T204 om-88, com algumas alterações. Cerca de 5 g da fracção de casca 40-60 mesh foi extraída num extractor tipo Soxhlet, utilizando-se cerca de 400 mL de uma solução de etanol/tolueno (1:2). Esta foi seca ao ar e posteriormente determinou-se o teor de humidade (Norma TAPPI 264om-88). O extracto foi evaporado até à secura num evaporador rotativo, acondicionado num exsiccador e pesado. A percentagem de extractáveis removidos da casca foi calculada.

Extracção sequencial da casca com diclorometano e metanol

Pesou-se 5 g da fracção de casca 20-40 mesh e submeteu-se a uma extracção em soxhlet com 400 mL de diclorometano durante 6 horas. Posteriormente a mesma casca foi submetida a uma segunda extracção com 400 mL de metanol. As soluções de extracto obtidas foram evaporadas até à secura e determinou-se o peso do *extracto seco* obtido para cada fracção.

Determinação de solubilidades em água e soluções aquosas

A determinação das solubilidades foi efectuada para água e soluções aquosas de NaOH e HCl para as condições experimentais resumidas na tabela 5. Posteriormente a solução foi filtrada a vácuo e a casca lavada com água. A casca foi seca numa estufa a 105°C até peso constante. As solubilidades em água quente, água fria, NaOH 0,1%, NaOH 1% e HCl 1% são determinadas pela seguinte expressão (m_1 - massa inicial da casca, m_2 - massa da casca após extracção):

$$S \left(\% \frac{m}{m \text{ casca seca}} \right) = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \times 100 \quad (3)$$

Tabela 5 Determinação da solubilidade da casca em água e soluções aquosas

Meio extractivo	Água fria	Água quente	NaOH 0,1%	NaOH 1%	HCl
Massa de casca (g)	2,5	2,5	1	1	2,5
Volume [44]	300	300	200	200	300
Sistema de extracção	Erlenmeyer com agitação constante	Refluxo	Refluxo	Refluxo	Refluxo
Temperatura (°C)	Ambiente	Ebulição	Ebulição	Ebulição	Ebulição
Tempo (h)	48	3	1	1	1
Norma Base	TAPPI 207om-93	TAPPI 207om-88	TAPPI 212om88	TAPPI 212om88	-

Determinação do teor de cinzas por gravimetria (%)

O teor de cinzas foi determinado em duplicado para a fracção 40-60 mesh sem qualquer tipo de tratamento com base na norma TAPPI T-211 om-93.

Determinação da Lenhina total

A lenhina de Klason, ou lenhina insolúvel, representa o resíduo sólido que fica após degradação e solubilização dos polissacarídeos. Existe uma parte da lenhina que é solubilizada e pode ser quantificada por métodos espectrofotométricos. A lenhina total é determinada pela soma da lenhina de Klason ou insolúvel e a lenhina solúvel e foi determinada de acordo com a norma TAPPI T222 om-88 e segundo o método padronizado Klason (1967) [87], com ligeiras alterações [88].

3.2.2 Análise de açúcares: hidrólise e metanólise

Hidrólise ácida convencional [87, 89]

Pesou-se uma toma de 10 mg de casca livre de extractáveis para um tubo de ensaio com esferas de vidro e submeteu-se a amostra a uma hidrólise primária à temperatura ambiente (20-25°C) durante 3 horas com 0,4 mL de uma solução de H₂SO₄ 72% m/m. Posteriormente adicionou-se 4,4 mL de água destilada e efectuou-se uma segunda hidrólise a 100°C durante 2,5 horas. Os tubos foram arrefecidos num banho de gelo, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,22 µm de porosidade para análise posterior no cromatógrafo iónico.

Quantificação do ácido acético e dos monossacarídeos existentes na casca por cromatografia iónica

Para a quantificação do ácido acético foi utilizado um cromatógrafo de modelo DX500 Dionex, equipado com uma coluna analítica IonPack AS14A (4 x 250 mm), uma pré-coluna IonPack AS14A (4 x 50 mm) e um detector amperométrico. O gradiente utilizado: isocrático, 25% de solvente A (solução NaOH 100 mM) e 75% de solvente B (H₂O ultra pura). O caudal estabelecido é de 1,20 mL/min, a temperatura 35 °C, pressão 1443 Psi e tempo de corrida 25 min. Entre cada corrida a coluna foi lavada/regenerada com uma solução 100 mM de NaOH durante 10 min e uma solução de NaOH 100 mM durante 20 min. O volume de injeção utilizado foi 25 µL. Para a determinação da fracção de ácido acético foi construída uma curva de calibração (massas relativas em função de áreas relativas) com ácido acético. O fluoreto foi utilizado como padrão interno.

Para a quantificação dos monossacarídeos (glucose, xilose, galactose, arabinose e manose) foi utilizado o mesmo cromatógrafo iónico mas com detector amperométrico. O equipamento é equipado com uma coluna CarboPac PA1 Dionex (4 x 250 mm) e pré-coluna CarboPac PA1 Dionex (4 x 50 mm). O solvente A corresponde ao eluente NaOH 2mM e o solvente B ao regenerante NaOH 0,3 M. O eluente foi NaOH 2 mM com caudal 1,0 mL/min. Para cada açúcar a quantificar foi construída uma curva de calibração (massas relativas em função de áreas relativas). A fucose foi utilizada como padrão interno e o volume de injeção foi 25 µL. Aplicou-se um factor de conversão (F.C.) que converte o teor de cada monómero no seu respectivo homopolímero (0,90 para as hexoses e 0,88 para as pentoses).

Análise de açúcares e ácidos urónicos por metanólise ácida

Pesaram-se 10 mg da casca livre de extractáveis e submeteu-se à metanólise ácida com 2mL de uma solução de HCl em metanol anidro 2 M. A reacção prosseguiu a 100°C e foram estudados diferentes tempos de reacção: 3 horas, 4 horas, 8 horas e 24 horas. Após reacção as amostras foram arrefecidas e congeladas até posterior análise por GC-FID e GC-MS.

Análise em GC-FID e caracterização em GC-MS

As amostras analisadas por GC foram neutralizadas com 100 µL de piridina e adicionou-se 1mL de uma solução de sorbitol em metanol anidro 0,1 g/L (padrão interno). O metanol foi removido por evaporação. Posteriormente acrescentou-se 200 µL de piridina, 200 µL do agente de silição N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL do catalisador trimetilclorosilano (TMSi). Colocaram-se os tubos num banho de óleo a 80°C durante 30 min.

As análises no GC-FID foram realizadas num cromatografo de gás DANI modelo GC1000 e o azoto foi utilizado como gás de arraste. A coluna usada foi uma coluna capilar apolar VB1 (30 m x 0,32 mm i.d., 0.25 µm de espessura). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial do injector 100°C, mantida por 1 min; primeira rampa de aquecimento: 4°C/min; temperatura final 175°C, mantida por 1 min; segunda rampa de aquecimento 12°C/min; temperatura final de 290°C, mantida por 15 min; temperatura do injector 260°C; temperatura do detector 290°C; razão split: 1:41.

As análises no GC-MS foram realizadas num cromatógrafo de gás modelo DSQ25, equipado com espectrometro de massa Finnigan Trace MS, utilizando hélio como gás de arraste (35 cm/s). A coluna usada foi DB-1 J&W (30 m x 0,32 mm i.d., 0,25 µm de espessura de filme). As condições cromatográficas foram iguais às referidas para o GC-FID.

Os compostos foram identificados com base nos seus derivados TMSi comparando o espectro de massa com dados bibliográficos e com a injeção de alguns padrões. Foi estimada a massa de cada composto identificado pela proporção da área do pico do composto em relação à área do padrão interno utilizado (sorbitol). Foi aplicada a seguinte equação:

$$m_{\text{composto}} = \frac{[Área]_{\text{composto}} \times m_{\text{padrão interno}}}{[Área]_{\text{padrão interno}}} \times F \quad (4) \quad \text{e} \quad F = \frac{\frac{[Área]_{\text{Composto}}}{[Área]_{\text{Padrão interno}}}}{\frac{m_{\text{composto}}}{m_{\text{Padrão Interno}}}} \quad (5)$$

O factor de resposta, F, foi determinado para cada um dos compostos identificados (tabela 6). Uma vez que o ácido-4-O-metil-glucurónico não existe disponível comercialmente, assumiu-se o mesmo valor obtido para o ácido glucurónico. Foi ainda aplicado o mesmo factor de correcção (0,90 -hexoses e 0,88 -pentoses) apresentado anteriormente.

Tabela 6 Factores de resposta obtidos para cada açúcar a estimar

Composto	Factores de Resposta	Composto	Factores de Resposta
arabinose	1,90	Galactose	1,51
xilose	1,14	Glucose	1,09
ramnose	1,03	ác. Galacturónico	1,87
manose	1,54	ác. Glucurónico	3,3

3.3 Determinação do teor de compostos fenólicos na casca pelo método de Folin-Ciocalteu

O teor de compostos fenólicos é quantificado pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965) [55] e modificado por Cadahía e colaboradores (1997) [27]. A concentração dos compostos fenólicos totais foi determinada em equivalentes de ácido gálico tendo-se preparado uma curva de calibração com ácido gálico entre 0 e 50 µg/L (anexo 2). Posteriormente pipetou-se 0,5 mL de cada um dos extractos previamente diluídos, padrões e respectivos brancos para tubos de vidro altos. Adicionou-se 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído previamente 10 vezes. Acrescentou-se mais 2 mL de uma solução aquosa saturada de carbonato de sódio 75 g/L. O conteúdo dos tubos de ensaio foi homogeneizado e colocado num banho de água a 50°C durante 5 min. Seguidamente os tubos foram rapidamente arrefecidos e, após 10 min no escuro, foram novamente homogeneizados no vortéx e procedeu-se à leitura de absorvância para um comprimento de onda de 760 nm, contra os respectivos brancos.

3.4 Determinação do poder anti-oxidante de redução do ião ferro (método de FRAP adaptado)

A actividade antioxidante é determinada pelo método de FRAP de acordo com Szollosi e Varga (2002) [90]. Este método baseia-se na quantificação da capacidade de redução do complexo Fe(III)-TPTZ (cor azul clara) para o complexo Fe(II)-TPTZ (cor azul escura) em meio ácido, reacção esta que é desencadeada pelo antioxidante presente na amostra [57]. O método consiste em adicionar a 0,1 mL do extracto a quantificar, 3 mL do reagente FRAP. Após 5 min é efectuada a leitura de absorvância a 593 nm. Os resultados são expressos em equivalentes de L-ácido ascórbico. É preparada uma solução mãe de aproximadamente 1 g/L de ácido ascórbico e 5 diluições de forma a construir uma recta de calibração entre 50 µmol/L e 600 µmol/L de L-ácido ascórbico (anexo 2).

O reagente FRAP deve ser preparado aquando da realização dos ensaios de quantificação e consiste na mistura indicada na tabela 7.

Tabela 7 Composição do reagente FRAP

<i>Reagente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade a adicionar (Reagente FRAP)</i>
Tampão Acetato	300 mmol/L e pH 3,6	25 mL
2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ) em 40 mmol/L HCl	10 mmol/L	2,5 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	20 mmol/L	2,5 mL

3.5 Determinação do teor relativo de proantocianidinas

As condições escolhidas para o método do ácido butanol foram as sugeridas por Hagerman (2011) [25] e seguidas por vários autores: 1,0 mL de amostra (ou branco) com 6,0 mL de reagente de butanol (n-butanol:HCl 95:5) e 0,2 mL de reagente de ferro (2% de sulfato de ferro amónio em 2 N HCl). A absorvância foi lida a 550 nm antes da reacção e após a reacção. A reacção foi realizada a 100°C durante 50 min. Pela diferença das absorvâncias (antes e após reacção) obteve-se a absorvância dada pela contribuição das antocianidinas. O branco foi realizado com as mesmas quantidades de reagente substituindo a amostra pelo solvente. Os resultados são expressos em equivalentes de extracto de mimosa.

3.6 Extracções da casca *E. globulus* nos Reactores MK e aplicação do modelo Box-Behnken

3.6.1 Descrição geral

As extracções da casca foram realizadas nas instalações do instituto RAIZ utilizando dois reactores m/k descontínuos com recirculação e com controlo de tempo e temperatura (figura 58, anexo 4). A razão líquido-sólido foi mantida constante e igual a 8: 500 g de casca (base seca) e 4 L de meio extractivo. O procedimento geral para cada ensaio envolveu a determinação da humidade da casca e o cálculo do respectivo volume de solvente a adicionar. Em todas as extracções a velocidade de aquecimento programada foi de 2°C/min. Após ser alcançada a temperatura desejada deu-se início à contagem do tempo de extracção. No fim de cada ensaio, despressurizou-se o digestor e recolheu-se o extracto após arrefecimento rápido até temperatura ambiente utilizando uma serpentina de refrigeração. Cada extracto foi filtrado através de uma malha de rede para remoção de partículas em suspensão provenientes do arrastamento físico da casca e procedeu-se ao desarejamento com N₂. Uma parte das amostras foi conservada em congelação e a outra em refrigeração. Procedeu-se também à evaporação do etanol e liofilização de um determinado volume de cada amostra obtida. A casca extraída também foi seca ao ar e guardada.

3.6.2 Desenho do conjunto de experiências a realizar segundo o modelo BBD

No estudo de optimização da actividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos é aplicada a metodologia de superfícies de resposta segundo o modelo Box-Behnken. Foram definidas as variáveis e a gama de intervalos a estudar: Tempo (min): 30 - 360; Temperatura (°C): 25 - 140; Concentração de etanol (%): 0 - 80. No total foram realizadas 15 experiências conforme descrito na tabela 11 (secção 4.2.1). Foram ainda realizadas duas experiências extra cujas condições estudadas também se encontram indicadas na tabela 11.

Para cada ensaio foram determinados os seguintes parâmetros: sólidos totais, o teor de cinzas, o teor de compostos fenólicos totais, a actividade antioxidante segundo o método FRAP e o teor de proantocianidinas. Para cada determinação foi construído um modelo matemático para obtenção das respectivas superfícies de resposta e posterior estudo de optimização. Os modelos matemáticos obtidos, a análise estatística e a optimização foram realizados com auxílio do software Unscrambler®v9.2. Para cada modelo obtido é efectuado o tratamento estatístico por análise de variância a um nível de significância 5%.

4 Resultados experimentais e discussão

4.1 Composição química da casca de *Eucalyptus globulus*

4.1.1 Análise sumária

Um dos objectivos deste trabalho contempla a caracterização da casca de *Eucalyptus globulus* quanto à sua composição química sumária. Na tabela 8 estão resumidos os resultados obtidos.

Tabela 8 Composição química sumária da casca de *Eucalyptus globulus* estudada

Parâmetro	%(m/m) ^(a)
Teor de humidade	
Fracção 40-60 mesh	12,41 ± 0,08
Fracção 20-40 mesh	11,92 ± 0,08
Teor em Cinzas	2,35 ± 0,06
Extractáveis em Etanol/Tolueno	2,19 ± 0,15
Extractáveis em Diclorometano	0,71 ± 0,19
Extractáveis em Metanol (após extracção com Diclorometano)	2,76 ± 0,03
Solubilidade:	
Água fria	2,45 ± 0,41
Água quente	8,14 ± 0,13
Solução aquosa NaOH 1%	24,80 ± 0,59
Solução aquosa de NaOH 0,1%	16,00 ± 0,16
Solução aquosa HCl 1%	30,28 ± 0,09
Lenhina	
Insolúvel (Klason)	17,95 ± 0,98
Solúvel	1,39 ± 0,19
Teor de açúcares quantificado ^(b)	71,42
Teor de ácido acético	5,34 ± 0,30

(a) Os resultados encontram-se expressos em base de casca seca.

(b) Corresponde ao somatório da arabinose, galactose, glucose e xilose obtidos por hidrólise ácida convencional com manose, ramnose, ácido galacturónico, ácido 4-O-metil-glucurónico obtidos por 14 horas de metanólise [91] (tabela 17, anexo 3).

Os valores obtidos enquadram-se, de um modo geral, no que é conhecido para a madeira [88]. O teor de compostos solúveis em água quente e em NaOH encontram-se acima do limite superior do intervalo referido na bibliografia [8, 88] para a madeira. As diferenças de valores obtidos para alguns dos dados conhecidos na bibliografia para casca de *E. globulus* podem ser explicados pela natural heterogeneidade da casca, cuja composição varia conforme a localização geográfica, idade da árvore, factores genéticos, etc [8]. No entanto, não tinha sido ainda realizada uma caracterização exaustiva da casca como a realizada neste trabalho, contemplando todos os componentes expectáveis na casca. A soma das percentagens de cinzas, extractáveis em etanol/tolueno, lenhina total, açúcares ácidos e neutros e fracção de

ácido acético é igual a 100,64%, valor este que excede muito pouco os 100%. Pode-se considerar um valor aceitável, considerando as limitações dos métodos analíticos e a complexidade da estrutura química da casca, que conduzem a contaminações recíprocas dos componentes isolados [92].

Tal como esperado, os rendimentos de extractáveis em etanol/tolueno e metanol são superiores ao rendimento obtido após extracção com diclorometano. O diclorometano sendo um solvente apolar, extrai apenas os compostos de natureza lipofílica, enquanto que os outros solventes são capazes de remover mais componentes hidrofílicos como compostos fenólicos, sais e hidratos de carbono de baixo peso molecular [6].

A amostra analisada apresenta um teor de cinzas de 2,35%, que se enquadra nos valores apresentados pela bibliografia (1,61%-3,53%) [8]. Tal como esperado, o teor de cinzas na casca é superior ao da madeira, pois a casca apresenta na sua composição um teor mais elevado em sais minerais (ver anexo 1, tabela 15).

Comparativamente com os dados bibliográficos indicados na tabela 1, a casca estudada apresenta uma maior solubilidade em água quente (8,14%). A solubilidade em água quente é ligeiramente superior à solubilidade em água fria (2,45%), tal como esperado, pois a água quente favorece a solubilidade de taninos e amido [6]. A casca estudada apresenta uma solubilidade em HCl 1% de 30,28%, superior às solubilidades com água quente (8,14%), com NaOH 1% (24,80%) e 0,1% NaOH (16,00%). Não é conhecido até à data bibliografia referente aos compostos solúveis em HCl. Possivelmente a solução de HCl promove a hidrólise de compostos existentes na casca, permitindo uma maior extracção de polissacarídeos. Mas só com a análise mais detalhada da composição do extracto obtido é que se poderão tirar conclusões.

O teor de lenhina total obtido é igual a 19,34% sendo que a fracção de lenhina de Klason é igual a 17,95% e lenhina insolúvel a 1,39%. Comparativamente com os dados conhecidos pela bibliografia, a lenhina de Klason apresenta um valor ligeiramente superior e a lenhina insolúvel um valor ligeiramente inferior. No global, o teor de lenhina total obtido enquadra-se nos valores indicados pela bibliografia 19,21% [7] e [18,6 - 23,0]% [8].

4.1.2 Análise de monossacarídeos: hidrólise ácida convencional e metanólise

A análise dos açúcares foi efectuada conforme descrito na secção 3.2.2 No anexo 3 são apresentados os espectros de massa obtidos para a metanólise da casca por 4 horas. Os polissacarídeos da casca são essencialmente celulose e hemicelulose. Estes compostos encontram-se ligados com a lenhina na matriz celular e, por essa razão o tipo de açúcares obtidos e a sua proporção também pode variar de acordo com o método de despolimerização

aplicado. Em geral deve-se escolher um método que tenha um bom compromisso entre a despolimerização do polissacarídeo com o menor grau de degradação.

A hidrólise ácida constitui um bom método de análise dos polissacarídeos complexos no entanto apresenta uma desvantagem em relação à metanólise: não permite realizar o estudo dos ácidos urónicos presentes na casca ou na madeira, uma vez que esta hidrólise degrada parte deles [93].

A metanólise em HCl anidro é um método considerado mais vantajoso pois é mais eficaz na clivagem da ligação glicosídica entre açúcares neutros e ácido 4-*O*-metilglucurónico. Por outro lado, a metanólise apresenta a desvantagem de apenas possibilitar o estudo da composição dos açúcares não cristalinos e mais acessíveis na matriz celular e podem promover reacções de descarboxilação [94-95]. Os monossacarídeos libertados são convertidos em metilglicosídeos e os grupos carboxilos dos ácidos urónicos são convertidos em ésteres metílicos [96]. A metanólise apresenta a vantagem de, mesmo após 24 horas de metanólise (1 M ou 2 M), os metilglicosídeos libertados são bastante estáveis [97]. Esta estabilidade deve-se ao consumo rápido do HCl após 2-3 horas de metanólise a temperaturas elevadas, cuja ausência de ácido está na origem da não degradação posterior [98].

A casca livre de extractáveis foi estudada quanto à sua composição em açúcares. Para o efeito de comparação, a casca foi submetida a dois tipos de hidrólise: hidrólise ácida com H₂SO₄ e metanólise ácida, conforme descrito na secção 3.2.2. O segundo processo teve como objectivo a quantificação simultânea dos resíduos de ácidos urónicos e açúcares neutros provenientes dos polissacarídeos não-cristalinos.

A figura 7 apresenta um cromatograma tipo obtido para diferentes tempos de reacção de metanólise da casca. Na tabela 9 é apresentada a identificação dos monossacarídeos correspondendo ao número indicado na figura 7.

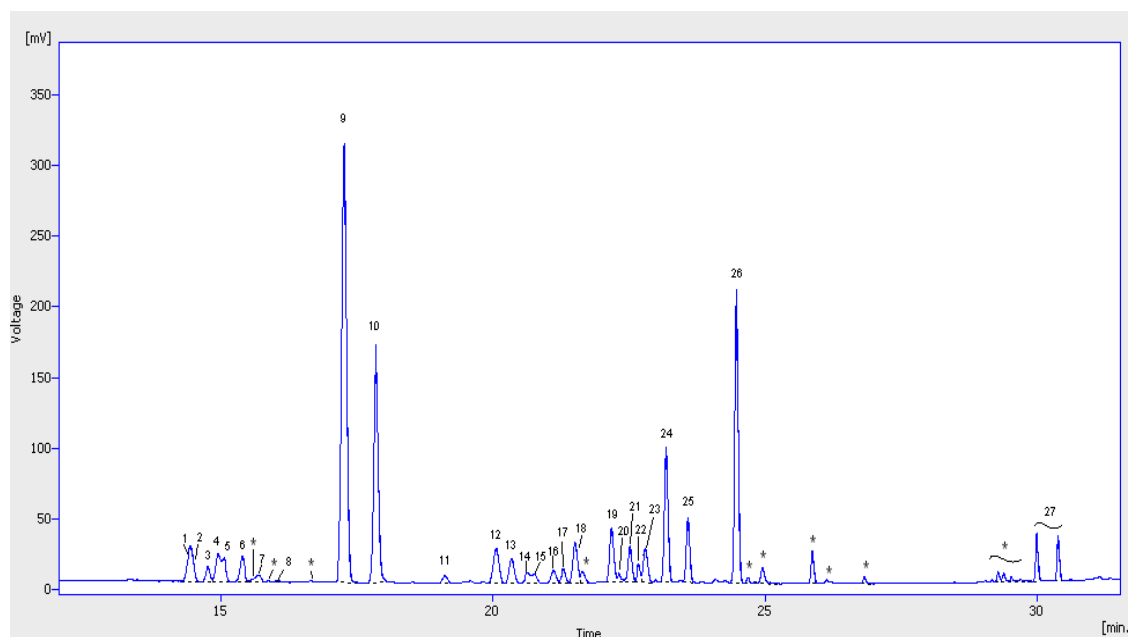


Figura 7 Cromatograma GC-FID dos produtos da metanólise da casca com tempo de reacção 3 horas. Para a identificação dos picos do cromatograma ver tabela 9.

Tabela 9 Compostos indicados no cromatograma da figura 7⁶

N.º	Nome do composto	N.º	Nome do composto	N.º	Nome do composto
1	α -f-arabinose	11	derivado não metilado da xilose	21	α -p-ácido galacturónico
2	β -p-arabinose	12	α -f-ácido galacturónico	22	β -p-ácido galacturónico
3	α -p-arabinose	13	ácido 4-O-metilglucurónico	23	β -p-galactose
4	α -f-xilose	14	ácido 4-O-metilglucurónico	24	α -p-glucose
5	β -f-xilose	15	derivado não metilado da xilose	25	β -p-glucose
6	α -p-ramnose	16	β -f-ácido galacturónico	26	padrão interno - sorbitol
7	β -f-arabinose	17	α -p-manose	27	Dímeros
8	derivado de pentose não metilado	18	α -f-galactose	*	Não identificado
9	α -p-xilose	19	α -p-galactose		
10	β -p-xilose	20	β -f-galactose		

Na figura 8 apresenta-se o estudo da metanólise da casca ao longo do tempo e os respectivos valores encontram-se indicados na tabela 17 do anexo 3. Podemos observar que o açúcar predominante é a xilose (entre 7,91% e 10,36%). Este resultado já era de se esperar pois a principal hemicelulose de *E. globulus* é a glucuronoxilana.

⁶ As hexoses e pentoses existentes nas hemiceluloses apresentam-se na forma cíclica em anel pirano (piranosídeos, p) ou anel furano (furanosídeos, f). A configuração anomérica α e β é utilizada para designar a orientação do grupo OH no carbono 1 na posição axial e equatorial, respectivamente.

Relativamente aos outros açúcares neutros, a glucose apresenta-se com rendimentos entre 1,54% e 2,28%, a galactose 1,84% e 2,07% e a arabinose 1,31% e 1,63%. Os açúcares que se apresentam em menor quantidade são a manose (0,23%- 0,42%) e ramnose (0,25% e 0.36%).

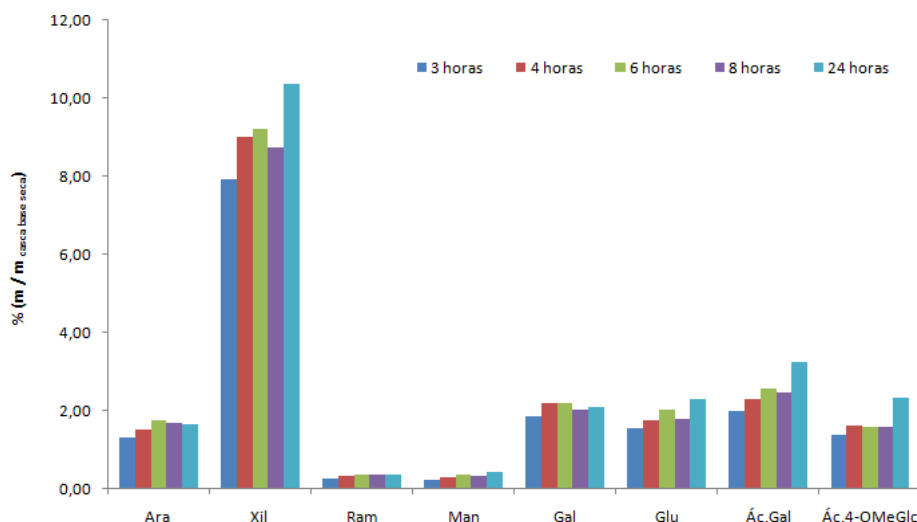


Figura 8 Comparação dos rendimentos de monossacarídeos obtidos para diferentes tempos de metanólise ácida, recorrendo a GC-FID.

Na metanólise identificaram-se ácido galacturónico (1,99%-3,23%) e ácido-4-*O*-metilglucurónico com um teor inferior (1,37%-2,31%).

Pelos dados da figura 8 também pode-se inferir que o prolongamento do tempo de metanólise não interfere significativamente com a quantidade obtida de cada monossacarídeo.

Comparativamente com tempos de reacção menores, a metanólise após 24 horas originou maiores percentagens de glucose, xilose, ácido galacturónico e ácido-4-*O*-metilglucurónico. No caso da glucose, o ligeiro aumento pode dever-se à libertação dos monossacarídeos da estrutura celulósica.

De acordo com Sundberg e colaboradores (1996) [99], a libertação de ácido 4-*O*-metilglucurónico não é total na metanólise e pode ocorrer alguma degradação dos monómeros formados (apesar desta degradação ser inferior ao observado na hidrólise ácida). Geralmente um intervalo de 3-5 horas é um bom compromisso para propiciar a libertação dos açúcares com baixa degradação dos ácidos urónicos. Contudo, na casca e na madeira, devem-se aplicar tempos de reacção maiores para permitir uma completa libertação dos açúcares da matriz.

Na análise dos açúcares por HPAEC/PAD (hidrólise convencional), não foi possível identificar a manose e a ramnose. Os resultados obtidos por GC-FID (metanólise) mostram que o teor destes monossacarídeos é baixo (figura 8 ou tabela 17 no anexo 3) e, possivelmente, nestas concentrações, não se atinge o limite de detecção no caso do HPAEC/PAD. Outro factor que pode justificar a não detecção da manose e da ramnose é a degradação dos próprios açúcares devido às condições de hidrólise a que a amostra é submetida.

Na figura 9 estabelece-se uma comparação com os resultados obtidos para a hidrólise ácida com H_2SO_4 (5,5 h), metanólise (24 h) e com os dados bibliográficos [7]. Pode-se observar que não existem diferenças muito significativas quanto aos rendimentos de hidrólise obtidos quando comparando com os dados bibliográficos e, as ligeiras variações observadas podem ser desencadeadas pelas diferenças dos métodos de hidrólise aplicados como também pela própria heterogeneidade da composição química da casca.

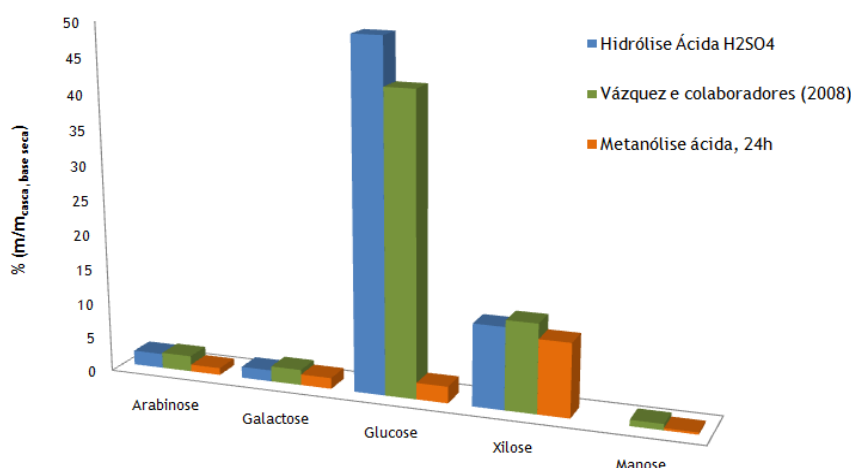


Figura 9 Comparação dos rendimentos de monossacarídeos obtidos por diferentes métodos: Hidrólise ácida com H_2SO_4 (análise por HPAEC/PAD) e Metanólise ácida (24 h, procedimento e análise por GC-FID). Comparação dos resultados experimentais com os resultados obtidos pelo autor Vázquez e colaboradores (2008) [7] (O método consiste numa hidrólise ácida com TFA 0,2 M, 1 h a 121°C e uma hidrólise enzimática posterior de 6 h a 30°C).

No entanto podemos visualizar que a quantidade de glucose apresenta valores muito diferentes entre a hidrólise com H_2SO_4 e a metanólise, respectivamente, 49,7% e 2,3%. Este resultado pode ser justificado pelo facto da celulose ser resistente à metanólise ácida, sendo que a maior parte deste monossacarídeo é essencialmente proveniente de outros polissacarídeos existentes na casca [91, 99] não cristalinos, mais especificamente de origem hemicelulósica (glucomananos) ou amido [100]. Desta forma, pelos resultados obtidos sugere-se que cerca de 4,6% da glucose quantificada por hidrólise advém de polissacarídeos não-celulósicos.

Relativamente aos outros monossacarídeos identificados no estudo, podemos verificar que não existem muitas diferenças entre a metanólise 24 horas e a hidrólise com H_2SO_4 . Na metanólise (24 horas) o rendimento de arabinose (1,63%) e xilose (10,36%) é ligeiramente inferior e o rendimento da galactose (2,07%) é superior.

4.1.3 Quantificação de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de *Folin-Ciocalteu* para o extracto de etanol/tolueno. Foi determinado o teor de compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico, sendo o valor obtido 16,4% $m_{EAG}/m_{extracto}$ (tabela 10).

Tabela 10 Teor de compostos fenólicos totais obtido para os extractos em etanol/tolueno, água quente, água fria, NaOH 1% e HCl 1% expressos em equivalentes de ácido gálico

	TFC % m_{EAG}/m_{casca}	TFC % $m_{EAG}/m_{extracto}$
Etanol / Tolueno	0,36	16,4
Água fria	0,75	30,6
Água quente	2,18	26,8
NaOH 1%	1,92	7,7
NaOH 0,1%	1,10	6,9
HCl 1%	2,63	8,7

Comparando os resultados para os extractos obtidos pelos 5 processos utilizados para a caracterização no que se refere ao teor de fenólicos em 100g de extracto, verifica-se em água fria uma selectividade maior para a extracção de compostos fenólicos (30,6%) apesar de apresentar uma solubilidade baixa (tabela 8).

Não existe muita bibliografia quanto ao teor de compostos fenólicos obtido nas condições de extracção estudadas. Por comparação com alguns valores indicados na tabela 2, podemos verificar que o teor de compostos fenólicos por 100 g de extracto obtido com extracção em solventes orgânicos (etanol e metanol) está compreendido entre 12%-13% [7], o que não difere muito do valor obtido na extracção com etanol/tolueno, apesar da polaridade diferente desta última mistura de solventes.

4.2 Extracções da casca *E. globulus* nos reactores MK e construção das Superfícies de Resposta

Os ensaios realizados foram definidos de acordo com a aplicação do modelo BBD e foram adicionadas três réplicas do ponto central para obter indicação da estabilidade do processo e variabilidade inerente.

Neste estudo, o modelo BBD foi aplicado para estudar o efeito das variáveis tempo (x_1), temperatura (x_2) e concentração de etanol (x_3) nas respostas teor de sólidos (Y_1), teor de cinzas (Y_2), teor de compostos fenólicos (Y_3 e Y_5) actividade antioxidante FRAP (Y_4 e Y_6) e teor de proantocianidinas (Y_7 e Y_8). Com recurso ao software *Unscrambler*® foram construídas as respectivas superfícies de resposta, com ajuste dos resultados experimentais obtidos a um polinómio de segunda ordem, recorrendo ao método dos mínimos quadrados. O estudo

estatístico foi efectuado por análise da variância para cada um dos modelos obtidos e avaliada a significância de cada modelo obtido.

A grande vantagem da aplicação de BBD reside na possibilidade de definir-se o conjunto de condições óptimas de tempo, temperatura e concentração de etanol que maximizam cada uma das respostas pretendidas, recorrendo a um conjunto de ensaios relativamente pequeno.

4.2.1 Características dos extractos obtidos

Cada extracto obtido foi caracterizado quanto ao teor de sólidos, cinzas, compostos fenólicos totais, TFC (em equivalente de ácido gálico, EAG), actividade anti-oxidante segundo o método FRAP (em equivalentes de ácido ascórbico, EAA). Foi ainda determinado o teor de proantocianidinas (em equivalentes de extracto mimosa, EEM) para os extractos obtidos. Os resultados experimentais encontram-se indicados na tabela 11.

Tabela 11 Resultados experimentais obtidos para os teores de sólidos totais, cinzas, fenólicos totais, actividade anti-oxidante FRAP e proantocianidinas segundo a aplicação BBD e para dois ensaios extra

Ensaio	Variáveis independentes			Variáveis dependentes							
	X ₁ (t, min)	X ₂ (T, °C)	X ₃ (CET, %)	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8
1	30	25	40	2,80	0,45	0,34	2,51	12,2	0,90	7,22	0,202
2	360	25	40	3,20	0,47	0,99	6,62	30,8	2,06	8,82	0,283
3	30	140	40	8,27	0,58	1,98	11,7	23,9	1,41	9,23	0,763
4	360	140	40	19,4	0,78	4,01	22,3	20,7	1,15	6,75	1,307
5	30	82,5	0	4,41	0,63	0,88	5,31	20,0	1,20	3,66	0,161
6	360	82,5	0	5,75	0,69	0,99	6,07	17,2	1,05	1,75	0,101
7	30	82,5	80	3,25	0,24	0,68	4,99	21,0	1,53	7,41	0,241
8	360	82,5	80	4,27	0,24	1,11	7,66	25,9	1,79	13,9	0,594
9	195	25	0	2,32	0,53	0,24	1,66	10,3	0,71	0,40	0,009
10	195	140	0	17,6	0,98	1,93	12,9	10,9	0,73	0,90	0,158
11	195	25	80	2,29	0,16	0,36	1,99	15,5	0,86	3,17	0,073
12	195	140	80	7,61	0,16	2,39	14,2	31,4	1,86	9,75	0,741
13	195	82,5	40	5,81	0,62	1,80	11,8	31,0	2,02	15,4	0,895
14	195	82,5	40	5,67	0,48	1,67	10,6	29,4	1,87	14,3	0,810
15	195	82,5	40	5,78	0,44	1,91	12,3	33,0	2,13	13,0	0,749
Extra											
16	30	45	40	3,79	0,45	0,93	3,64	24,6	0,96	9,86	0,374
17	195	45	40	4,07	0,46	1,08	5,84	26,4	1,43	11,3	0,458

Legenda: Y₁ Rendimento de extracção (%m/m_{casca}); Y₂ Cinzas (%m/m_{casca}); Y₃ TFC (%m_{EAG}/m_{casca}); Y₄ Actividade anti-oxidante FRAP (%mmol_{EAA}/g_{casca}); Y₅ TFC (%m_{EAG}/m_{extracto}); Y₆ Actividade anti-oxidante FRAP (mmol_{EAA}/g_{extracto}); Y₇ Proantocianidinas (%m_{EEM}/m_{extracto}); Y₈ Proantocianidinas (%m_{EEM}/m_{casca}).

A análise dos resultados pontuais fornece algumas indicações do efeito de cada variável e da associação entre variáveis nos parâmetros analisados. No entanto, a análise baseada nas superfícies de resposta, explorada na secção 4.2.2, elucidará de forma mais clara e fundamentada estes mesmos efeitos.

Os resultados apresentados na tabela 11 demonstram que o maior rendimento de extracção em sólidos totais foi obtido para o **ensaio 4** com 360 min de extracção, 140°C e 40% de etanol: 19,4%, 4,01% m_{EAG}/m_{casca} , 22,3% $mmol_{EAA}/g_{casca}$ e 1,307% m_{EEM}/m_{casca} .

Verifica-se também que o efeito da temperatura no rendimento de extracção para 40% de etanol é bastante significativo (por exemplo, no **ensaio 1**, para 30 min, 40% solvente e 25°C o teor de sólidos é de 2,8% e alterando a temperatura para 140°C, **ensaio 3**, esse valor é 3 vezes maior, 8,27%). Para tempos de extracção elevados (**ensaios 2 e 4**) o efeito da temperatura é acentuado, verificando-se um aumento de 6 vezes (3,2% para 19,4%).

Os ensaios que deram origem a uma maior selectividade na extracção de compostos fenólicos totais e compostos com actividade anti-oxidante foram os **ensaios 2** (360 min, 25°C e 40% etanol) com os valores 30,8% $m_{EAG}/m_{extracto}$ e 2,06 $mmol_{EAA}/g_{extracto}$, o **ensaio 12** (195 min, 140°C e 80% etanol) com os valores 31,4% $m_{EAG}/m_{extracto}$ e 1,86 $mmol_{EAA}/g_{extracto}$ e ainda os **ensaios 13, 14 e 15** (195 min, 82,5°C e 40% etanol) cujos valores médios foram 31,1% $m_{EAG}/m_{extracto}$ e 2,01 $mmol_{EAA}/g_{extracto}$.

Estabelecendo uma comparação entre o **ensaio 4 e 10** em que ambas as experiências foram realizadas à mesma temperatura de 140°C mas sendo um deles (**ensaio 10**) realizado em meio extractivo de água e com metade do tempo (195 min), foi obtido um rendimento de extracção (17.6%) semelhante ao do **ensaio 4**. Constata-se também, que neste caso particular, a polaridade do solvente interfere nos rendimentos de extracção. Este facto também foi demonstrado por Vázquez e colaboradores (2008) [7]. No entanto, nestas condições o teor de fenólicos totais (10,9% $m_{EAG}/m_{extracto}$) e actividade anti-oxidante (0,73 $mmol_{EAA}/g_{extracto}$) representam cerca de metade dos valores obtidos para o **ensaio 4**. Este resultado sugere que a água como meio extractivo, a 140°C, embora proporcione um rendimento alto, não favorece a extracção de compostos fenólicos.

A comparação do rendimento obtido no **ensaio 9** (2,32%) com o do **ensaio 10** (17.6%), realizado para as mesmas condições experimentais mas com uma temperatura de 25°C, evidencia que, com água, o efeito da temperatura é significativo: o rendimento é cerca de 8 vezes menor a 25°C, no entanto, o conteúdo em compostos fenólicos e em compostos com actividade anti-oxidante no extracto é semelhante nos dois ensaios (cerca de 10%). Esta observação evidencia que temperaturas mais altas (caso do **ensaio 10**) não favorecem a selectividade, pois proporcionam a remoção de material de outra origem mas, por outro lado,

proporcionam um valor absoluto (em % de casca) maior em compostos fenólicos e com actividade anti-oxidante. Isto permite conjecturar que estas condições, água e 25°C, podem não constituir uma boa opção visando a obtenção de compostos fenólicos pois nestas condições apenas os compostos mais acessíveis são removidos da matriz lenhocelulósica.

Já quando se altera o solvente para 40% (**ensaios 1 e 2**) a 25°C verifica-se aumento ligeiro no rendimento de extracção mas um aumento significativo em fenólicos totais e compostos com actividade anti-oxidante sugerindo que concentrações próximas de 40% favorecem a extracção deste tipo de compostos, facto este que poderá ser constatado mais à frente com os modelos matemáticos obtidos.

Pela análise dos resultados dos pares de ensaios com os mesmos tempos, mas a temperaturas extremas (**ensaios 1 e 3** - 40% etanol, **ensaios 9 e 10** - água, **ensaios 11 e 12** - 80% etanol) verifica-se que o aumento da percentagem de etanol provoca um maior efeito positivo do aumento da temperatura (de 25°C para 140°C) no teor de fenólicos no extracto, ou seja, na selectividade. O mesmo já não acontece quando se analisa o rendimento da extracção, em que o efeito do aumento da temperatura é máximo para o meio de extracção água.

Pela tabela 11 constata-se que os **ensaios 13 a 15** (195 min, 82,5°C e 40% etanol) são os que apresentam um maior valor em proantocianidinas com valor médio de 14,2% $m_{EEM}/m_{extracto}$, seguindo-se o **ensaio 8** (360 min, 82,5 e 80% etanol) com 13,9% $m_{EEM}/m_{extracto}$. Para estes ensaios a actividade anti-oxidante é respectivamente de 2,01 $mmol_{EAA}/g_{extracto}$ (valor médio) e 1,79 $mmol_{EAA}/g_{extracto}$. O **ensaio 9** (195 min, 25°C e água) é o que originou um extracto com teor de proantocianidinas mais baixo (0,40% $m_{EEM}/m_{extracto}$), reflectindo-se também na baixa actividade anti-oxidante obtida (0,71 $mmol_{EAA}/g_{extracto}$).

Torna-se interessante estabelecer uma comparação entre os **ensaios 13 a 15** e o **ensaio 2** (360 min, 25°C e 40% etanol) que apresenta um teor de proantocianidinas de 8,82% $m_{EEM}/m_{extracto}$ (mais baixo que os primeiros) e actividade anti-oxidante mais elevada 2,06 $mmol_{EAA}/g_{extracto}$. Possivelmente nestas condições experimentais outros compostos fenólicos extraídos que não proantocianidinas contribuem neste caso de forma mais pronunciada para a actividade anti-oxidante.

Na tabela 2 (secção 2.1.3) pode verificar-se que para uma extracção com água, 90°C, razão sólido-líquido 1:15 e duração 1 hora, o teor de extractáveis obtido é 6,8%, sendo 18,1% $m_{EAG}/m_{extracto}$ em fenólicos totais e 0,912 $mmol_{EAA}/g_{extracto}$ em actividade anti-oxidante FRAP [7]. Estabelecendo uma comparação com os **ensaios 5 e 6** que contemplam o efeito da água e temperatura 82,5°C para diferentes tempos (30 e 360 min, respectivamente) verifica-se que os resultados são muito próximos destes, apesar do facto do tempo de extracção e da razão solido:liquido ser diferente. As mesmas semelhanças foram encontradas entre os **ensaios 13 a**

15 (195 min, 82,5°C e 40% etanol) e os dados da tabela 2 para extracção com 50% etanol, 2 horas, razão sólido:líquido 1:15 e temperatura aproximada de 82°C.

Pela figura 10 pode-se verificar que existe uma boa correlação de linearidade entre o teor de fenólicos totais e a actividade anti-oxidante determinada (0,9866), tal como esperado. Este facto já foi verificado para a casca de madeira e outros extractos vegetais [7, 26, 40-41, 101-102].

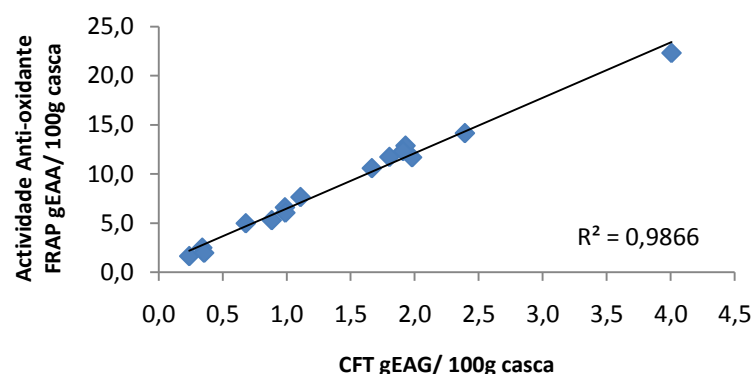


Figura 10 Correlação entre a actividade anti-oxidante e o teor de compostos fenólicos totais obtida para os ensaios referentes ao modelo Box-Behnken.

4.2.2 Construção do modelo matemático e análise ANOVA

Com o conjunto de resultados experimentais foi construído um modelo quadrático para cada variável dependente estudada que melhor ajusta esses resultados (descrito na secção 2.3) Os modelos obtidos são traduzidos pelas seguintes equações⁷ (x_1 : tempo; x_2 : temperatura e x_3 : % etanol).

Rendimento da extracção %m/m_{casca}

$$Y_1 = -3,05 + 1,05 \times 10^{-2} x_1 + 9,19 \times 10^{-2} x_2 - 3,97 \times 10^{-2} x_3 + 2,67 x_1 x_2 - 2,50 x_2 x_3 + 2,95 x_2^2$$

Teor de Cinzas %m/m_{casca}

$$Y_2 = 5,53 \times 10^{-1} + 2,08 \times 10^{-4} x_1 + 1,90 \times 10^{-3} x_2 - 6,33 \times 10^{-3} x_3 - 1,13 \times 10^{-1} x_2 x_3$$

Compostos fenólicos totais %m_{EAG}/m_{casca}

$$Y_3 = -2,47 \times 10^{-1} + 2,43 \times 10^{-3} x_1 + 1,82 \times 10^{-2} x_2 + 1,55 \times 10^{-3} x_3 - 1,39 \times 10^{-1} x_1^2 + 1,74 \times 10^{-1} x_2^2 - 7,39 \times 10^{-1} x_3^2$$

⁷A variável de intersecção β_0 de cada equação foi recalculada por regressão PLS ("Partial least squares regression"). As variáveis de interacção e quadráticas foram multiplicadas pelo factor de correcção de 1,75 (obtido pelo software Unscrambler®). As variáveis x_i são ajustadas para um valor compreendido entre -1 e 1 calculado pela

seguinte equação $\dot{x} = x_i - \bar{x} / x_{i_máx} - \bar{x}$.

Actividade anti-oxidante FRAP %mmolEAA/gcasca

$$Y_4 = -5,85 \times 10^{-1} + 1,38 \times 10^{-2} x_1 + 1,05 \times 10^{-1} x_2 + 9,00 \times 10^{-3} x_3 - 4,28 x_3^2$$

Compostos fenólicos totais %m_{EAG}/m_{extracto}

$$Y_5 = 20,86 + 1,33 \times 10^{-2} x_1 + 3,96 \times 10^{-2} x_2 + 1,11 \times 10^{-1} x_3 - 5,46 x_1 x_2 - 2,63 x_1^2 - 6,62 x_2^2 - 7,47 x_3^2$$

Actividade anti-oxidante FRAP mmol_{EAA}/g_{extracto}

$$Y_6 = 1,45 + 7,69 \times 10^{-4} x_1 + 1,34 \times 10^{-3} x_2 + 7,37 \times 10^{-3} x_3 - 3,58 \times 10^{-1} x_1 x_2 - 1,36 \times 10^{-1} x_1^2 - 4,90 \times 10^{-1} x_2^2 - 4,75 \times 10^{-1} x_3^2$$

Proantocianidinas %m_{EEM}/m_{extracto}

$$Y_7 = 8,03 + 2,81 \times 10^{-3} x_1 + 1,52 \times 10^{-2} x_2 + 8,60 \times 10^{-2} x_3 - 4,55 x_2^2 - 5,88 x_3^2$$

Proantocianidinas %m_{EEM}/m_{casca}

$$Y_8 = -3,34 \times 10^{-3} + 6,96 \times 10^{-4} x_1 + 5,22 \times 10^{-3} x_2 + 3,81 \times 10^{-3} x_3 - 4,55 \times 10^{-1} x_3^2$$

Para cada modelo matemático construído foi efectuada a análise de variância ANOVA de forma a avaliar a significância dos vários modelos, considerando um intervalo de confiança de 95%. Salienta-se o facto de alguns termos não significativos terem sido eliminados no sentido de melhorar os modelos obtidos.

Na tabela 12 encontram-se indicados os parâmetros de correlação e significância obtidos para os efeitos das variáveis (lineares, interacção e quadráticos) e os diferentes modelos. Nesta tabela também encontram-se indicados os coeficientes de correlação entre os resultados previstos e os obtidos: pode-se verificar que existe uma boa correlação dos valores experimentais com os previstos para todas as variáveis dependentes estudadas.

Todos os modelos obtidos são significativos com um grau de confiança 95% (apresentam um valor de $p < 0,05$).

A qualidade dos modelos construídos face ao ajuste dos dados experimentais é obtida pela análise do parâmetro «falta de ajuste». Embora para Y_1 se verifique uma boa correlação entre os resultados experimentais e os previstos pelo modelo, tendo sido obtido também uma boa correlação do modelo, obteve-se um valor de p significativo (0,0016) - falta de ajuste - sugerindo que o modelo que descreve a variação dos dados para o rendimento da extracção (Y_1) pode ser significativamente melhorado com a inclusão de novos pontos experimentais.

Tabela 12 Resultados experimentais obtidos para os teores de sólidos totais, cinzas, fenólicos totais, actividade anti-oxidante FRAP e proantocianidinas para os ensaios previstos pela aplicação do modelo Box-Behnken e dois ensaios extra

Significância dos Modelos (p)	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈
Modelo	0,0002	0,0001	0,0010	<0,0001	0,0353	0,0302	0,0021	0,0004
Coefficientes								
β ₀	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
x ₁	0,0189	0,3155	0,0227	0,0070	0,2390	0,2760	0,6092	0,0994
x ₂	< 0,0001	0,0070	0,0001	<0,0001	0,2228	0,4965	0,3442	0,0008
x ₃	0,0275	<0,0001	0,6741	0,6040	0,0354	0,0287	0,0035	0,0364
x ₁ x ₂	0,0127	-	-	-	0,0575	0,0507	-	-
x ₁ x ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
x ₂ x ₃	0,0171	0,0337	-	-	-	-	-	-
x ₁ ²	-	-	0,5265	-	0,3291	0,4178	-	-
x ₂ ²	0,0092	-	0,4292	-	0,0332	0,0172	0,0063	-
x ₃ ²	-	-	0,0078	0,0015	0,0204	0,0198	0,0013	0,0006
Falta de ajuste	0,0016	0,6322	0,0676	0,1623	0,0983	0,1291	0,1794	0,1281
R²	0,941	0,888	0,905	0,918	0,814	0,823	0,842	0,849

Legenda: Y1 Rendimento de extracção (%m/mcasca); Y2 Cinzas (%m/mcasca); Y3 TFC (%mEAG/mcasca); Y4 Actividade anti-oxidante FRAP (%mmolEAA/gcasca); Y5 TFC (%mEAG/mextracto); Y6 Actividade anti-oxidante FRAP (mmolEAA/gextracto); Y7 Proantocianidinas (%mEEM/mextracto); Y8 Proantocianidinas (%mEEM/mcasca).

4.2.3 Superfícies de resposta e pontos óptimos

Nas figuras 11 a 15 apresentam-se as representações de superfície de resposta para as variáveis dependentes estudadas.

Uma vez que o teor de cinzas obtido para os diferentes extractos não ultrapassa 0,9% do extracto e o seu comportamento com o tempo, temperatura e concentração de etanol é semelhante ao rendimento de extracção, optou-se por não apresentar as superfícies de resposta obtidas.

Pela análise da figura 11.A pode verificar-se que para valores de temperaturas baixas o prolongamento do tempo de extracção não tem efeito no rendimento de extracção, permanecendo sempre baixo. No entanto, o aumento da temperatura provoca, por si só, um aumento no rendimento de extracção, mesmo com tempos de extracção baixos com meio de extracção 40% de etanol. O mesmo efeito é observado com o meio extractivo água (0% de etanol) (figura 11.B) verificando-se que a temperatura exerce um efeito mais significativo do que o tempo. De facto, o efeito isolado da temperatura é mais significativo ($p < 0,0001$) do que o efeito combinado da temperatura com o tempo ($p = 0,0127$).

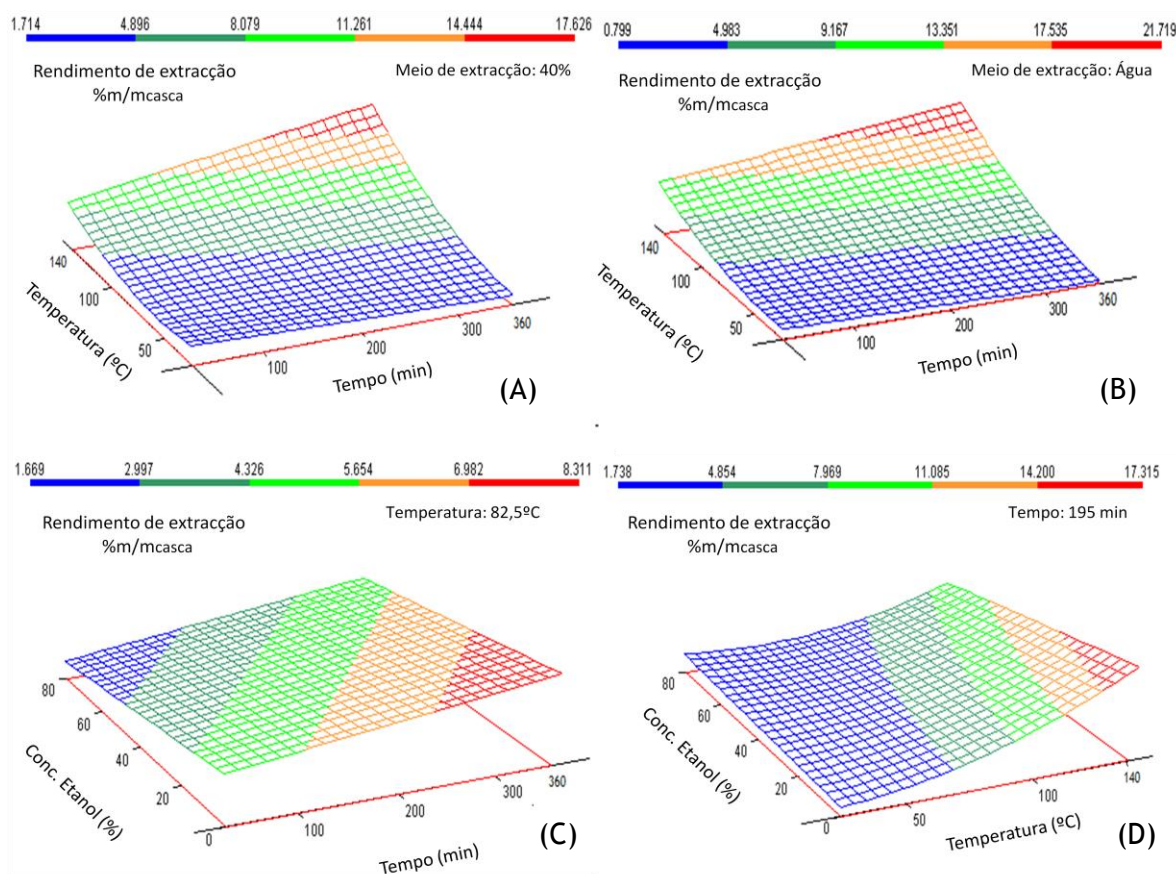


Figura 11 Representação das superfícies de resposta obtidas para o rendimento de extração em função dos pares de variáveis independentes: tempo e temperatura para 40% de etanol (A) e para água (B), % de etanol e tempo para $T=82.5^{\circ}\text{C}$ (C) e % de etanol e temperatura para $t=195\text{ min}$ (D).

No entanto, verifica-se que quanto menor a concentração de etanol maior é a quantidade de material extraído por unidade de casca, ou seja, o rendimento aumenta notoriamente com a diminuição da percentagem de etanol, sendo favorecido pelo prolongamento do tempo a uma temperatura de 82.5°C (figura 11.C). Este efeito é observado para valores de temperatura superior a cerca de 50°C como é evidenciado na figura 11.D em que, para baixas percentagens de etanol, o rendimento da extração aumenta de forma acentuada com a temperatura.

Na figura 12 apresentam-se as superfícies de resposta obtidas para o rendimento em compostos fenólicos totais e de compostos com actividade anti-oxidante. Estas duas variáveis estudadas apresentam resposta semelhante com o tempo, temperatura e percentagem de etanol dada a relação linear que apresentam entre si, tal como indicado na figura 10.

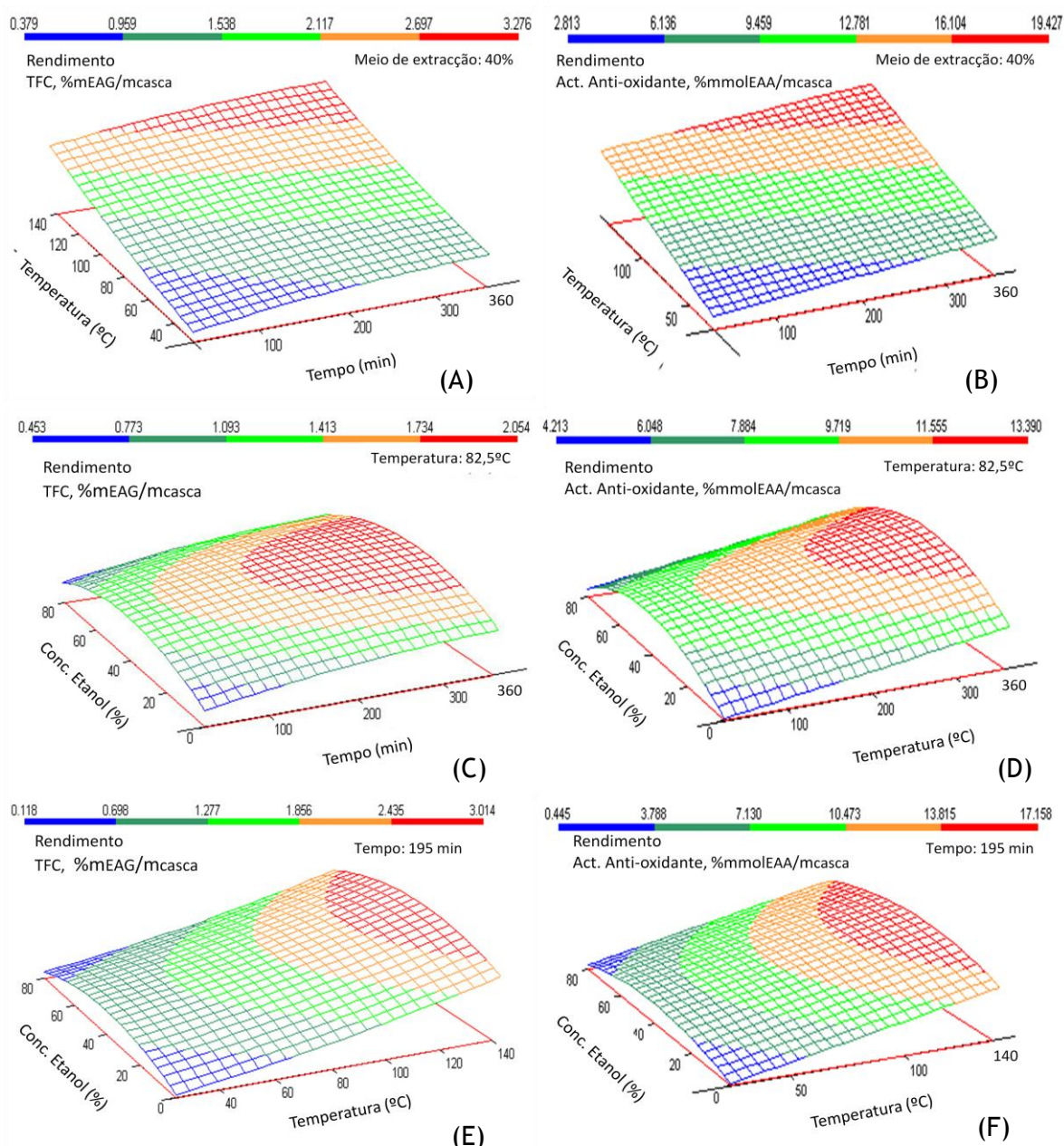


Figura 12 Representação das superfícies de resposta obtidas para o teor em compostos fenólicos totais (A, C, E) e para a actividade anti-oxidante FRAP (B, D, F) por massa de casca em função dos pares de variáveis independentes temperatura e tempo para 40% de etanol- A e B, % de etanol e tempo para T 82.5°C- C e D e % de etanol e temperatura para t=195 min -E e F.

As figuras 12.A e 12.B demonstram que o tempo e a temperatura favorecem a extracção de compostos fenólicos totais e compostos com actividade anti-oxidante, sendo o efeito de temperatura mais significativo ($p < 0,0001$) em ambas as respostas. O óptimo de percentagem etanol no meio extractivo situa-se entre 25 e 75%. Sugere-se que a percentagem óptima de etanol representa o melhor compromisso entre a difusão do solvente na matriz da casca, a solubilização dos compostos e a sua difusão para o exterior, favorecendo assim o rendimento de extracção em compostos polifenólicos e compostos com actividade anti-oxidante.

Na figura 13 apresentam-se as superfícies de resposta obtidas para a selectividade de extracção em compostos fenólicos totais e de compostos com actividade anti-oxidante, que demonstram também um comportamento semelhante entre si com o tempo, temperatura e percentagem de etanol.

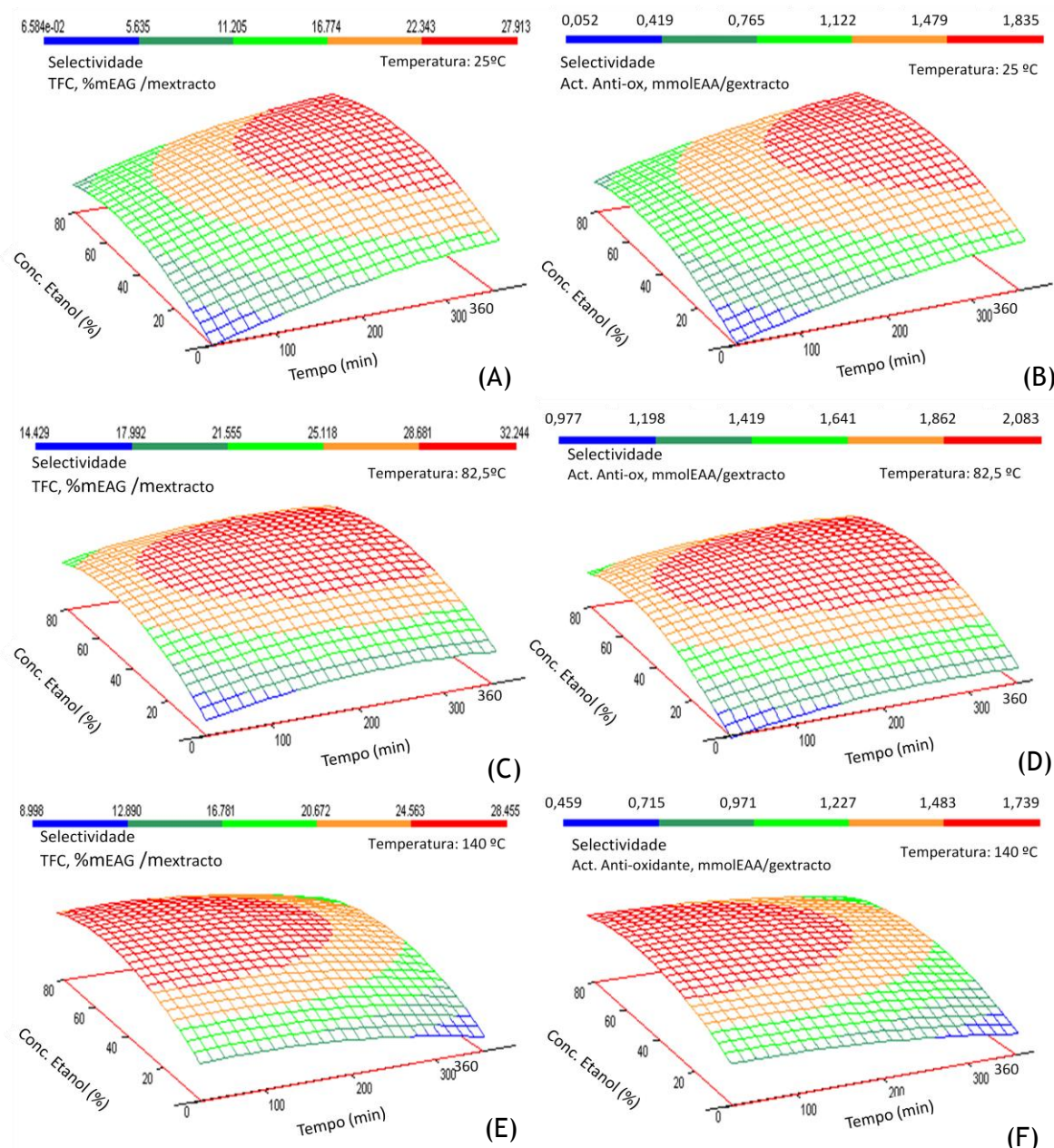


Figura 13 Representação das superfícies de resposta obtidas para o teor em compostos fenólicos totais (A, C, E) e para a actividade anti-oxidante FRAP (B, D, F) por massa de extracto (selectividade) em função do par de variáveis independentes % de etanol e temperatura para 3 tempos de extracção: 30 min - A e B, 195 min - C e D e 360 min - E e F.

Para tempos de extracção curtos (30 min, figuras 13.A e 13.B), o aumento da percentagem de etanol e temperatura provocam um aumento da percentagem de compostos fenólicos totais extraídos em relação a outros componentes. No entanto, à medida que o tempo de extracção se prolonga (figuras 13.C, 13.D e 13.E, 13.F) observa-se que para atingir o ponto máximo de

selectividade ($29\text{--}32\%$ $m_{\text{EAG}}/m_{\text{extracto}}$ e $1,90\text{--}2,09$ $\text{mmol}_{\text{AAE}}/\text{g}_{\text{extracto}}$) a temperatura óptima é deslocada para valores mais baixos. Estas observações demonstram que há um compromisso entre tempo e temperatura na selectividade. A análise das superfícies da figura 14 confirma o efeito referido: o tempo beneficia a selectividade de extracção excepto quando a temperatura é muito elevada.

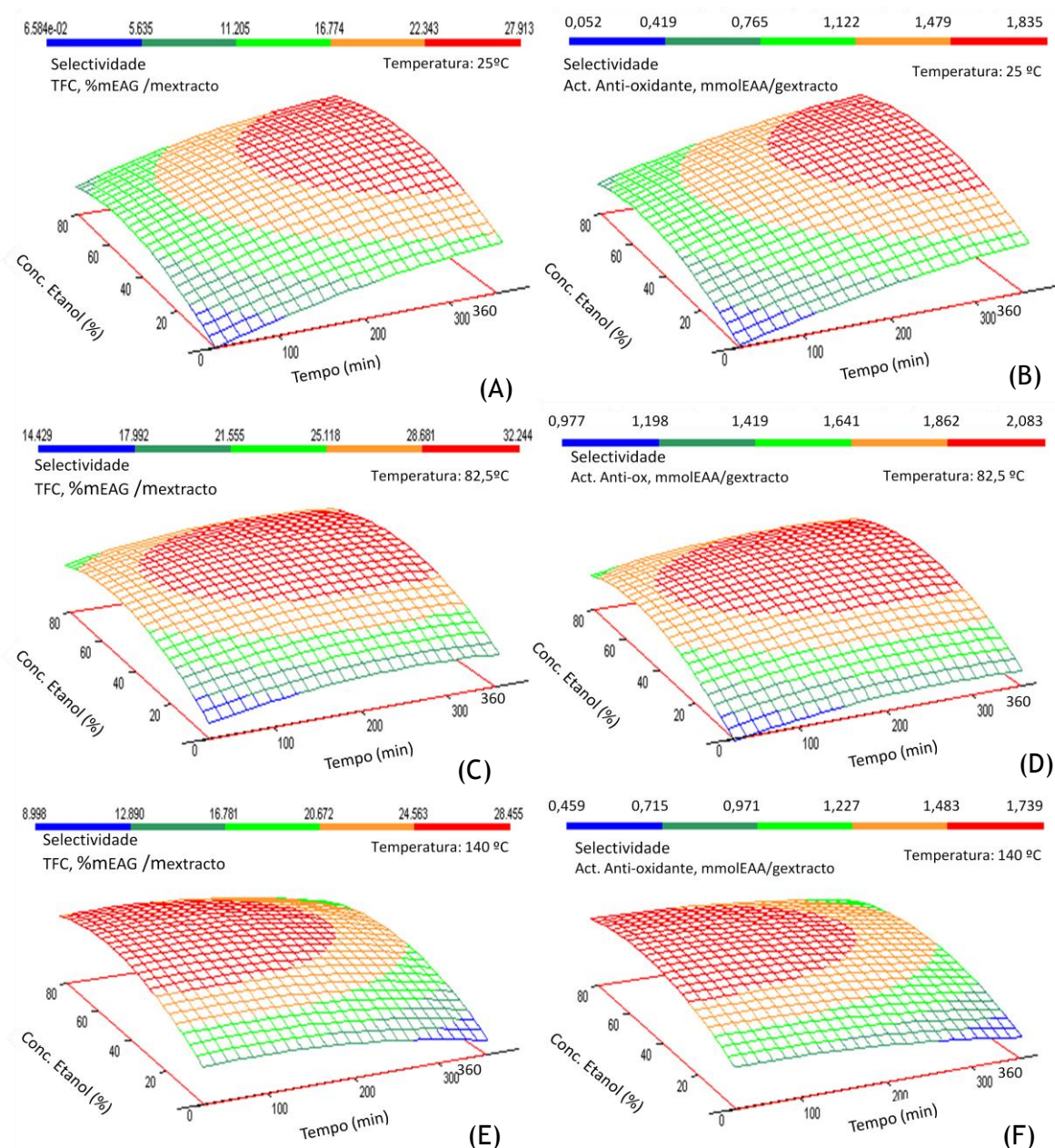


Figura 14 Representação das superfícies de resposta obtidas para o teor em compostos fenólicos totais (A, C, E) e para a actividade anti-oxidante FRAP (B, D, F) por massa de extracto (selectividade) em função do par de variáveis independentes % de etanol e tempo para 3 temperaturas de extracção: 25°C - A e B, 82,5°C - C e D e 140°C - E e F.

Este efeito do tempo é traduzido na análise ANOVA efectuada para os modelos, demonstrando que os efeitos lineares do tempo e da temperatura não são significativos mas os seus efeitos

quadráticos já apresentam um valor de significância inferior a 0,05. Ou seja, para tempo de extracção baixo a selectividade aumenta com a temperatura possivelmente devido à solubilização de compostos fenólicos mais acessíveis da casca. Quando a temperatura é elevada, a selectividade diminui com o prolongamento do tempo, provocado pelo aumento da extracção de outros componentes da casca para além dos compostos pretendidos neste estudo (estes resultados traduzem-se na elevada significância do efeito quadrático da temperatura, mais pronunciado na actividade anti-oxidante).

Ao estabelecer uma comparação com entre os diferentes modelos obtidos pode-se verificar que embora a água apresente um bom rendimento de extracção, a selectividade para fenólicos melhora com a adição de etanol até um intervalo de percentagem centrado em aproximadamente 50% etanol.

Embora o rendimento (nas suas diferentes formas) aumente com o aumento da temperatura, a temperatura mais elevada não beneficia a selectividade quanto ao teor de compostos fenólicos totais e compostos com actividade anti-oxidante FRAP.

Na figura 15 apresentam-se algumas superfícies de resposta obtidas para o modelo encontrado para a variação do rendimento (figura 15.A) e a selectividade (figura 15.B-15.D) de extracção de proantocianidinas.

O rendimento teórico máximo em Proantocianidinas ($1,14\% \text{ m}_{\text{EEM}}/\text{m}_{\text{casca}}$) foi registado nas condições limite de tempo e temperatura estudadas (360 min, 140°C) e concentração de etanol 43,3%. Nestas condições o extracto contém $10,3\% \text{ m}_{\text{EEM}}/\text{m}_{\text{extracto}}$ de proantocianidinas.

Pelas figuras 15.B e 15.D verifica-se que a concentração de etanol e a temperatura exercem uma influência quadrática significativa para a selectividade de extracção de proantocianidinas. O efeito quadrático da concentração revelou ser o mais significativo no modelo obtido ($p=0,0016$).

Pela figura 15.D verifica-se ainda que a água é o meio extractivo que menos favorece a selectividade de extracção de proantocianidinas e que só a partir de concentrações de 20% é que a selectividade é favorecida de uma forma notória.

O teor máximo relativo de proantocianidinas obtido foi de $14,27\% \text{ m}_{\text{EEM}}/\text{m}_{\text{extracto}}$, para as condições 360 min, 87°C e 53,3% de etanol (figura 15.D). Nestas condições as proantocianidinas representam 0,854% da casca.

Pela análise da figura 15.B pode constatar-se que o tempo exerce pouca influência na selectividade das proantocianidinas, pois o rendimento máximo obtido nas mesmas condições mas em 30 min foi apenas cerca de 7% inferior ao valor máximo obtido para 360 min.

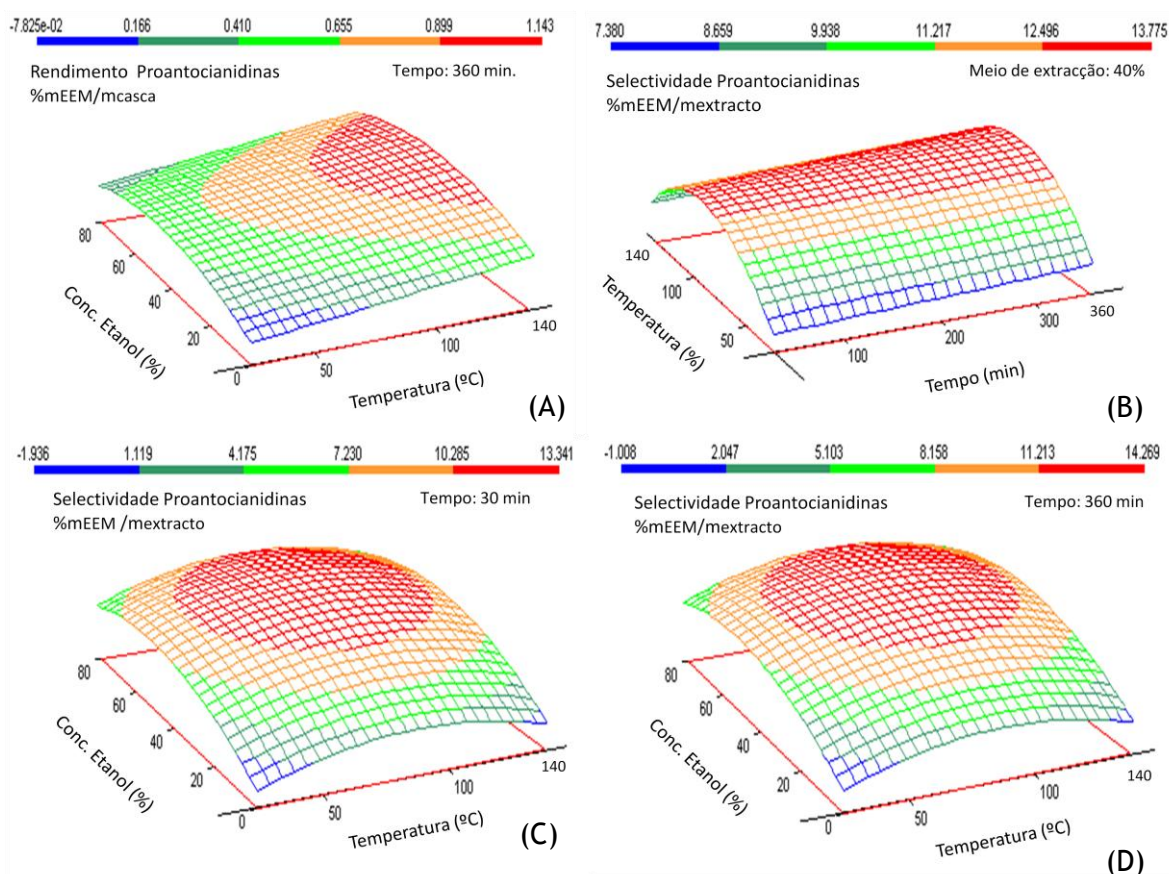


Figura 15 Representação das superfícies de resposta obtidas para os valores em proantocianidinas por massa de casca em função do par de variáveis concentração de etanol e da temperatura para 360 min (A); por extracto em função do par de variáveis independentes temperatura e tempo: 40% de etanol (B); e em função da temperatura e % etanol: 30 min (C) e 360 min (D).

Convém salientar que os modelos obtidos para o rendimento e a selectividade de proantocianidinas apresentam valores negativos (figura 15.C e 15.D), o que está relacionado com o ajuste do modelo ao facto de que em meio extractivo água não ocorre extracção de proantocianidinas.

Na tabela 13 apresenta-se as duas regiões óptimas identificadas para a selectividade de extracção de compostos fenólicos e compostos com actividade anti-oxidante. Ambas as regiões obtidas são para tempos de extracção elevados (264 min para Y_5 e 310 min para Y_6) e temperaturas e concentração de etanol intermédias (82,5°C e 52% etanol para Y_5 e 72,4°C e 52% etanol para Y_6).

Nos modelos construídos para Y_3 e Y_4 não se atingiu nenhuma região óptima, tendo-se apenas registado como rendimento mais elevado 3,28% m_{EAG}/m_{casca} (Y_3), conseguida para 360 min, 46,7% etanol e 140°C, e 19,43% $mmol_{EAA}/g_{casca}$ (Y_4) obtida para 360 min, 43,3% de etanol e 140°C.

Tabela 13 Valores previstos para as condições óptimas propostas pelos modelos matemáticos construídos: Y5 - teor de compostos fenólicos totais e Y6 - teor de compostos com actividade antioxidante FRAP

Resposta	Variáveis independentes			Valor previsto
	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração Etanol (%)	
Y ₅ %m _{EAG} /m _{extracto}	264	82,5	52	32,254
Y ₆ mmol _{EAA} /g _{extracto}	310	72,40	52	2,09

Foram realizados dois ensaios experimentais (ensaio 16 e 17 indicados na tabela 11) que permitem obter uma indicação da validade dos modelos construídos na previsão de valores. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 14.

Tabela 14 Valores previstos e obtidos experimentalmente para as duas extracções realizadas à temperatura de 45°C, 40% de etanol e tempos 30 min (ensaio 16) e 360 min (Ensaio 17).

	Y ₁		Y ₂		Y ₃		Y ₄		Y ₅		Y ₆		Y ₇		Y ₈	
Ensaio	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17
Valor Experimental	3,8	4,1	0,5	0,5	0,9	1,1	5,8	7,2	24,6	26,5	1,54	1,76	9,9	11,3	0,37	0,46
Valor Previsto	2,8	2,8	0,4	0,4	0,6	1,2	4,9	7,2	18,5	26,9	1,25	1,75	10,3	10,8	0,40	0,52
Erro relativo (%)	35,0	45,5	14,8	8,0	44,6	8,7	18,7	0,3	33,2	1,5	23,2	0,6	3,9	4,6	0,46	0,52
Média erro relativo (%)	40,2		11,4		26,7		9,5		17,4		11,9		4,3		9,5	

Legenda: Y₁ Rendimento de extracção (%m/m_{casca}); Y₂ Cinzas (%m/m_{casca}); Y₃ TFC (%m_{EAG}/m_{casca}); Y₄ Actividade anti-oxidante FRAP (mmol_{EAA}/g_{casca}); Y₅ TFC (%m_{EAG}/m_{extracto}); Y₆ Actividade anti-oxidante FRAP (mmol_{EAA}/g_{extracto}); Y₇ Proantocianidinas (%m_{EEM}/g_{extracto}); Y₈ Proantocianidinas (%m_{EEM}/m_{casca}).

Pela tabela pode-se verificar que os erros relativos estimados são aceitáveis para a maioria dos modelos obtidos. No modelo Y₁ relativo ao rendimento de extracção foi o modelo que apresentou um erro relativo mais elevado de 40,2%. Contudo, deve-se ter em consideração que estes valores obtidos são apenas uma indicação do desempenho dos modelos construídos e que, para os ensaios 16 e 17 devem ser realizados pelo menos em triplicado.

5 Conclusões

No presente trabalho foi efectuado pela primeira vez uma caracterização sumária completa exaustiva da casca de *Eucalyptus globulus*. O somatório dos teores em cinzas, extractáveis em etanol/tolueno lenhina total e polissacarídeos é aproximadamente igual a 100%. Dado que neste somatório ainda não está contabilizado o teor em compostos fenólicos alguns resultados poderão estar sobrevalorizados como por exemplo, o teor de lenhina total por uma fracção de compostos fenólicos. Os teores em material solúvel em diferentes meios polares são superiores aos referidos para a madeira, confirmando que a casca contém elevado teor em compostos fenólicos, que constituem cerca de 30% do material solubilizado em água. Foi desenvolvida uma nova metodologia para a quantificação de açúcares na casca de *E. globulus* através da combinação da hidrólise ácida convencional com 24 horas de metanólise 2 M. O teor de polissacarídeos totais é 72,4%, sendo os principais celulose (49,7%) e xilanas (soma de xilose, ácido acético e ácido 4-O-metil-glucurónico - 18.0%).

O modelo Box-Behnken foi aplicado com sucesso no estudo da influência das variáveis independentes tempo (30-360 min), temperatura (25-140 °C) e concentração de etanol (água e misturas aquosas de etanol 40% e 80%) no teor de sólidos totais, teor de cinzas, teor de compostos fenólicos e actividade anti-oxidante (variáveis dependentes) dos extractos obtidos. Os resultados experimentais foram ajustados a um polinómio de segunda ordem e a análise estatística ANOVA foi efectuada para um intervalo de confiança de 95%. Os modelos obtidos foram significativos e os resultados previstos apresentam um bom ajuste aos resultados experimentais.

Constatou-se que o rendimento de extracção aumenta com a temperatura mas não é favorecido pelo aumento da percentagem de etanol, que atenua mesmo o efeito positivo da temperatura no rendimento. Por outro lado, verificou-se que extracções com temperatura e concentração de etanol intermédias favorecem a selectividade de compostos fenólicos e a actividade anti-oxidante. Ou seja, é crucial encontrar um compromisso entre o rendimento de extracção e a obtenção de extractos com maior teor em compostos fenólicos e actividade anti-oxidante, ou seja, de maior grau de pureza.

Na gama de condições estudadas, o rendimento de extracção máximo obtido (21.7% m/m_{casca}) foi verificado para 360 min, 140°C e água. Contudo, nestas condições a selectividade para os compostos fenólicos, actividade anti-oxidante e proantocianidinas não é favorecida apresentando rendimentos baixos.

As condições encontradas que favorecem a extracção de compostos fenólicos são 264 min, 82,5°C e 52% e apresentam um valor máximo de compostos fenólicos de 32,2% m_{EAG}/m_{extracto},

que representa 1.9% da massa de casca (em EAG). Nestas condições obtém-se 11.8% $\text{mmol}_{\text{AAE}}/\text{g}_{\text{casca}}$ (compostos com actividade anti-oxidante) e 0,77% $\text{m}_{\text{EEM}}/\text{m}_{\text{casca}}$ (em proantocianidinas).

Relativamente à quantidade de proantocianidinas, foi obtido um máximo próximo da região óptima de selectividade de fenólicos mas, com um comportamento em relação ao tempo diferente: o tempo exerce pouca influência nos teores obtidos. Estes resultados revelam que o parâmetro da selectividade em proantocianidinas não será limitante para a definição do intervalo óptimo de extracção de compostos fenólicos e com actividade anti-oxidante FRAP.

Os rendimentos obtidos podem eventualmente ser melhorados através do aumento da razão entre o volume de solvente/massa de casca utilizada (hidromódulo) na extracção. Neste trabalho, pretendeu-se manter o hidromódulo num valor constante e moderado, assegurando apenas que a recirculação do solvente se faria livremente e não seria impedida após a impregnação da casca.

Este trabalho permitiu comprovar o potencial da casca como fonte de compostos fenólicos com actividade anti-oxidante que podem ser extraídos em condições moderadas (cerca de 80°C com meio de extracção 1:1 etanol:água). Considerando uma produção anual de casca de cerca de 45 mil ton (para uma unidade industrial com capacidade para 500 mil toneladas de pasta) pode obter-se cerca de 900 ton de material de origem fenólica com actividade anti-oxidante.

Ao estabelecer uma comparação com alguns resultados obtidos para extractos de fontes diferentes verifica-se que o teor de compostos fenólicos máximo determinado pelo modelo é inferior ao extracto de casca de *Acacia confusa* obtido por Chang e colaboradores (2001) [103], 47% $\text{m}_{\text{EAG}}/\text{m}_{\text{extracto}}$, e ao extracto de casca de *Pinus Radiata* obtido por Ku et al (2007) [104], 62,9% $\text{m}_{\text{CE}}/\text{m}_{\text{extracto}}$. Relativamente ao extracto de *E. globulus* obtido por Vázquez e colaboradores (2011) [83] apresentado na secção 2.3.1 (21,9% $\text{m}_{\text{EAG}}/\text{m}_{\text{extracto}}$ e 1,328 $\text{mmol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{extracto}}$) verifica-se que neste trabalho foi possível obter um teor de compostos fenólicos e de actividade anti-oxidante maiores.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objectivos Realizados

O trabalho desenvolvido permitiu atingir os objectivos propostos com sucesso. Salienta-se apenas uma alteração na estratégia inicial do trabalho, que contemplava a extracção da casca em balões de fundo redondo com os solvenes em refluxo. Face aos rendimentos de extracção baixos dificultando a obtenção de extracto seco para análise, avançou-se directamente para as extracções em escala semi-piloto.

6.2 Limitações e Trabalho Futuro

Foram identificadas duas regiões óptimas considerando a selectividade para a extracção de compostos fenólicos e de compostos com actividade anti-oxidante. É importante referir que as regiões óptimas identificadas nos modelos têm de ser validadas experimentalmente. Assim, como trabalho futuro prevê-se a realização de 3 extracções em cada ponto óptimo encontrado de forma a verificar a robustez dos modelos apresentados e efectuar a sua caracterização química de forma a identificar os principais compostos presentes. É necessário ainda proceder à caracterização mais detalhada dos extractos que exibem um rendimento ou selectividade elevados para conhecer melhor a sua composição química e determinar quais os factores mais importantes a considerar na fase seguinte. Prevê-se a identificação e quantificação de alguns compostos fenólicos por HPLC-DAD, a quantificação de açúcares nos extractos por metanólise ácida, a determinação do teor taninos hidrolisáveis e a determinação da actividade biológica dos extractos através da colaboração com o CEBAL.

Por fim, será estudada a aplicação de processos de separação aos extractos seleccionados visando obter um extracto enriquecido em compostos fenólicos e/ou uma fracção particular desta família de compostos.

6.3 Apreciação final

O trabalho desenvolvido é importante na perspectiva de Biorefinaria aplicada a material lenhocelulósicos pois insere-se no âmbito de valorização da casca de *Eucalyptus globulus*, um sub-produto produzido em grandes quantidades e que face à sua riqueza de composição química está actualmente subaproveitado. Considero que os resultados apresentados são de grande importância para o conhecimento do impacto das condições de extracção na composição do material extraído. O desenho experimental através do modelo Box-Behnken foi aplicado pela primeira vez a esta matéria-prima, elucidando qual potencial deste material

como fonte de compostos fenólicos. Este trabalho abriu também muitas perspectivas de trabalho futuro, que considero que são um dos melhores contributos que uma tese pode ter.

Referências

1. Kamm, B. e Kamm, M., *Chem. Ing. Tech.*, **79**(5): 592-603, **2007**.
2. Clark, J., Budarin, V., Deswarte, F., Hardy, J., Kerton, F., *et al.*, *Green Chem.*, **8**: 853-886, **2006**.
3. Harborne, J. e Williams, C., *Phytochemistry*, **55**(6): 481-504, **2000**.
4. Hollman, P. e Katan, M., *Food Chem. Toxicol.*, **37**(9-10): 937-942, **1999**.
5. Kamm, B., Kamm, M., Schmidt, M., Hirth, T. e Schulze, M., Lignocellulose-based Chemical Products and Product Family Trees em *Biorefineries - Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions* (Eds.: Kamm, B., Gruber, P., e Kamm, M.), Wiley-VCH Weinheim, 97-150, **2006**.
6. Rowell, M., Pettersen, R., Han, J., Rowell, J. e Tshabalada, M., Cell Wall Chemistry em *Handbook of wood chemistry and wood composites* (Ed.: Rowell, Roger M.), CRC Press, Florida, **2005**.
7. Vázquez, G., Fontela, E., Santos, J., Freire, M., González-Álvarez, J., *et al.*, *Ind. Crop. Prod.*, **28**(3): 279-285, **2008**.
8. Pereira, H., *Wood Fiber Sci.*(20): 82-90, **1988**.
9. Domingues, R., Sousa, G., Freire, C., Silvestre, A. e Neto, C., *Ind. Crop. Prod.*, **31**(1): 65-70, **2009**.
10. Freire, C., Silvestre, A., Neto, C. e Cavaleiro, J., *Holzforschung*, **56**(4): 372-379, **2002**.
11. Santos, S., Freire, C., Domingues, M., Silva, A. e Neto, C., em *The 3rd Nordic Wood Biorefinery Conference*, Stockholm, Sweden, **2011**, pp. 403-404.
12. Maekawa, E., Ichizawa, T. e Koshijima, T., *J. Wood Chem. Technol.*, **9**: 549-567, **1989**.
13. Eyles, A., Davies, N., Yuan, Z. e Mohammed, C., *Forest Pathol.*, **33**(5): 317-331, **2003**.
14. Hillis, W. e Yazaki, Y., *Phytochemistry*, **13**(2): 495-498, **1974**.
15. Eyles, A., Davies, N. e Mohammed, C., *Trees - Structure and Function*, **18**(2): 204-210, **2004**.
16. Freire, C., Pinto, P., Santiago, A., Silvestre, A., Evtuguin, D., *et al.*, *Bioresources* **1**(1): 3-17, **2006**.
17. Harun, J. e Labosky, P. J., *Wood Fiber Sci.*(17): 327-335, **1985**.
18. Puls, J., *Macromol. Symp.*, **120**(1): 183-196, **1997**.
19. Shatalov, A., Evtuguin, D. e Neto, C., *Carbohydr. Res.*, **320**(1-2): 93-99, **1999**.
20. Evtuguin, D., Tomás, J., Silva, A. e Neto, C., *Carbohydr. Res.*, **338**(7): 597-604, **2003**.
21. Boerjan, W., Ralph, J. e Baucher, M., *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**: 519-546, **2003**.
22. Rowell, R. M., ed. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. CRC Press, Florida, **2005**.
23. Evtuguin, D., Neto, C., Silva, A., Domingues, P., Amado, F., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **49**(9): 4252-4261, **2001**.
24. Pizzi, A., Tannins: Major Sources, Properties and Applications em *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 1 ed. (Eds.: Belgacem, M. N. e Gandini, A.), Elsevier, Oxford, **2008**.

25. Hagerman, A. The Tannin Handbook, 2011. Disponível em <http://www.users.muohio.edu/hagermae/>, consultado a 30/06/2011.
26. Vázquez, G., González-Alvarez, J., Santos, J., Freire, M. e Antorrena, G., *Ind. Crop. Prod.*, **29**(2-3): 364-370, 2009.
27. Cadahía, E., Conde, E., Simón, B. e García-vallejo, M., *Holzforschung*, **51**(2): 125-129, 1997b.
28. Conde, E., Cadahia, E., Diez-Barra, R. e García-Vallejo, M. C., *Eur. J. Wood Wood Prod.*, **54**(3): 175-181, 1996.
29. Yazaki, Y. e Hillis, W. E., *Phytochemistry*, **15**: 1180-1182, 1976.
30. Conde, E., Cadahia, E., Garcia Vallejo, M. C. e Simon, B. F., *Holzforschung*, **49**(5): 411-417, 1995.
31. Fechtal, M. e Riedl, B., *Holzforschung*, **45**(4): 269-273, 1991.
32. Kim, J.-P., Lee, I.-K., Yun, B.-S., Chung, S.-H., Shim, G.-S., *et al.*, *Phytochemistry*, **57**(4): 587-591, 2001.
33. Mukhatar, H., Das, M., Khan, W., Wang, Z., Bik, D., *et al.*, *Can. Res.*, **48**(9): 2361-2365, 1988.
34. Hertog, M., Hollman, P. e Venema, D., *J. Agric. Food Chem.*, **40**(9): 1591-1598, 1992.
35. Meltzer, H. e Malterud, K., *Scand. J. Nutr.*, **41**(2): 50-57, 1997.
36. Hagerman, A., Riedl, K., Jones, G., Sovik, K., Ritchard, N., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **46**(5): 1887-1892, 1998.
37. Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **48**(9): 3890-3897, 2000.
38. Rubilar, M., Pinelo, M., Ihl, M., Scheuermann, E., Sineiro, J., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **54**(1): 59-64, 2005.
39. Agbor, G., Oben, J., Ngogang, J., Xinxing, C. e Vinson, J., *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 6819-6824, 2005.
40. Soong, Y.-Y. e Barlow, P. J., *Food Chem.*, **88**(3): 411-417, 2004.
41. Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. e Oomah, B. D., *J. Agric. Food Chem.*, **46**(10): 4113-4117, 1998.
42. Halliwell, B. e Gutteridge, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **280**(1): 1-8, 1990.
43. Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., de Pasquale, A., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 4718-4723, 1999.
44. Rice-Evans, C., Miller, N., Bolwell, P., Bramley, P. e Pridham, J., *Free Radic Res.*, **22**(4): 375-383, 1995.
45. Wang, H., Cao, G. e Prior, R., *J. Agric. Food Chem.*, **44**(3): 701-705, 1996.
46. Heinonen, I., Meyer, A. e Frankel, E., *J. Agric. Food Chem.*, **46**(10): 4107-4112, 1998.
47. Vinson, J., Dabbagh, Y., Serry, M. e Jang, J., *J. Agric. Food Chem.*, **43**(11): 2800-2802, 1995.
48. Rice-Evans, C. e Miller, N., *Methods Enzymol.*, **234**: 279-283, 1994.
49. Rice-Evans, C., Miller, N. e Paganga, G., *Free Radic Biol. & Med.*, **20**(7): 933-956, 1996.
50. Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M., Gopinathan, V. e Milner, A., *Clin. Sci.*, **84**(407-412), 1993.
51. Heimann, W. e Reiff, F., *Fette Seifen Anstr-Mittel*, **55**: 451-458, 1953.
52. Shahidi, F. e Wanasundara, P., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**(1): 67-103, 1992.

53. Huang, D., Ou, B. e Prior, R., *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 1841-1856, 2005.
54. Frankel, E. e Meyer, A., *J. Sci. Food Agric.*, **80**(13): 1925-1941, 2000.
55. Singleton e Rossi, *J. Enol. Vitic.*(16): 144-158, 1965.
56. Stevanato, R., Fabris, S. e Momo, F., *J. Agric. Food Chem.*, **62**: 6287-6293, 2004.
57. Benzie, I. e Strain, J., *Anal. Biochem.*, **239**: 70-76, 1996.
58. Schofield, P., Mbugua, D. e Pell, A., *Anim. Feed Sci. Technol.*, **91**(1-2): 21-40, 2001.
59. Hopkinson, C. S., Buffam, I., Hobbie, J., Vallino, J., Perdue, M., *et al.*, *Biogeochemistry*, **43**(3): 211-234, 1998.
60. Box, G., Hunter, J. e Hunter, W., *Statistics for Experimenters*, 2 ed., Wiley-Interscience, New York, 2005.
61. Box, G. e Wilson, K., *Journal of the Royal Statistical Society* **13**: 1-45, 1951.
62. Nakai, S., Li-chan, E. e Dou, J., eds., *Chapter 9: Experimental Design and Response-Surface Methodology*, Handbook of Food and Bioprocess Modeling Techniques, ed. Shyam Sablani, *et al.* Taylor & Francis Group, LLC, 2006.
63. Bruns, R., Scarminio, I. e Neto, B., *Statistical Design - Chemometrics*, Vol. 25, 1 ed., Elsevier, Amesterdam, 2006.
64. Massart, D., Vandeginste, B., Buydens, L., de Jong, S., Lewi, P., *et al.*, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Amesterdam, 1977.
65. Ferreira, S., Bruns, R., Ferreira, H., Matos, G., David, J., *et al.*, *Anal. Chim. Acta*(597): 179-186, 2007.
66. Escribano-Bailon, M. e Santos-Buelga, C., *Methods in Polyphenol Analysis em Polyphenol extraction from foods*, 1 ed. (Eds.: Santos-Buelga, C. e Williamson, G.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2003, pp. 1-16.
67. Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J. e Nunez, M., *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 2111-2117, 2005.
68. Mafard, P. e Béliard, E., *Génie Industriel Alimentaire: Tome II, Techniques séparatives*, 2 ed., Lavoisier, 1992.
69. Derkyi, N., Adu-Amankwa, B., Sekyere, D. e Darkwa, N., *Berkeley Electronic Press*, **6**(1): 1-22, 2011.
70. Jichang, W., Zhenyu, W., Ziluam, F., Lili, Z., Shuangqi, T., *et al.*, *Advanced Materials Research* **183-185**: 1874-1878, 2011.
71. Contents em *Handbook of Food and Bioprocess Modeling Techniques*, CRC Press, 2006.
72. Gan, C. e Latiff, A., *Food Chem.*, **124**: 1277-1283, 2011.
73. Bai, X., Yue, T., Yuan, Y. e Zhang, H., *J. Sep. Sci.*, **33**: 3751-3758, 2010.
74. Çam, M. e Aaby, K., *J. Agric. Food Chem.*, **58**(16): 9103-9111, 2010.
75. Cao, X., Wang, C., Pei, H. e Sun, B., *J. Chromatography A*, **1216**: 4268-4274, 2009.
76. Rodrigues, S., Gustavo, G. e Fernandes, F., *Ultrason. Sonochem.*, **15**: 95-100, 2008.
77. Khan, M., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A., Dangles, O. e Chemat, F., *Food Chem.*, **119**: 851-858, 2010.
78. Liu, W., Yu, Y., Yang, R., Wan, C., Xu, B., *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **11**(11): 4750-4763, 2010.
79. Souza, C., Bott, R. e Oliveira, W., *Lat. Am. J. Pharm.*, **26**(5): 682-690, 2007.
80. Vázquez, G., Freire, M., Santos, J., Antorrena, G. e González-Álvarez, J., *Waste Biomass Valor*, **1**: 219-225, 2010.
81. Stévigny, C., Rolle, L., Valentini, N. e Zeppa, G., *J. Sci. Food Agric.*, **87**: 2817-2822, 2007.

82. Zhang, L., Chen, J., Wang, Y., Wu, D. e Xu, M., Molecules, **15**: 3567-3577, **2010**.
83. Vázquez, G., Santos, J., Freire, M., Antorrena, G. e González-Álvarez, J., Wood Sci. Technol.: 1-15, **2011**.
84. Yang, L., Jiang, J., Li, W., Chen, J., Wang, D., *et al.*, J. Sep. Sci., **32**: 1437-1444, **2009**.
85. Derkyi, S., Adu-Amankwa, B., Sekyere, D. e Darkwa, A., JETEAS, **2**(1): 64-69, **2011**.
86. Brusotti, G., Ngueyem, T., Biesuz, R. e Caccialanza, G., J. Sep. Sci., **33**: 1692-1667, **2010**.
87. Browning, B., em Methods of wood chemistry, Vol. Vol 2, Interscience Publishers, New York, **1967**.
88. Pinto, P., Comportamento da Lenhina de *Eucalyptus globulus* durante o processo de deslenhificação kraft, Universidade de Aveiro **2000**.
89. Saeman, J., Moore, W., Mitchel, R. e Millet, M., Tappi **37**: 366-343, **1954**.
90. Szollosi, R. e Varga, I., Acta Biologica Szegediensis, **46** (3-4): 125-127, **2002**.
91. Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., *et al.*, Ind. Crop. Prod., **29**(2-3): 571-580, **2009**.
92. Fengel, D. e Wegener, G., Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions (Ed.: Gruyter, W. de), N.Y., **1984**, pp. cap. 6, 132.
93. Pulls, J., In: Bioconversion of forest and agricultural plant residues. C.A.B. International, Wallingford, UK: 13-32, **1993**.
94. Bertraud, F., Sundberg, A. e Holmbom, B., Carbohydrate Polym., **48**: 319-324, **2002**.
95. Biermen, C. J., Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, **46**: 251-271, **1988**.
96. Huang, Y., Indrarti, L., Azuma, J. e Okamura, K., Mokuzai Gakkaishi, **38**(2): 1168-1171, **1992**.
97. Chambers, R. e Clamp, J., Biochem. J., **125**: 1009-1018, **1971**.
98. Preuss, A. e H.P.; T., Z. Lebensm. Unters. Forsch., **176**: 5-11, **1983**.
99. Sundberg, A., Sundberg, K., Lillandt, C. e Holmbom, B., Nord. Pulp Paper Res. J., **11**(4): 216-219, **1996**.
100. Lisboa, S. A., Evtuguin, D. V., Neto, C. P. e Goodfellow, B. J., Carbohydrate Polymers, **60**(1): 77-85, **2005**.
101. Maksimovic, Z., Malencic, D. e Kovacevic, N., Bioresour. Technol., **96**(8): 873-877, **2005**.
102. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. e Byrne, D., J. Food Comp. Anal., **19**(6-7): 669-675, **2006**.
103. Chang, S., Wu, J., Wang, S., Kang, P., Yang, N., *et al.*, J. Agric. Food Chem., **49**: 3420-3424, **2001**.
104. Ku, C., Jang, P. e Mun, s., J. Wood Sci., **53**: 524-528, **2007**.
105. Cadahía, E., Conde, E., Gracia-Vallejo, M. e Simón, B., Holzforschung, **51**(2): 119-124, **1997a**.
106. Freire, C., Pinto, P., Santiago, A., Silvestre, A., Evtuguin, D., *et al.*, Bioresources **1**(1): 3-17, **2006**.

Anexo 1 Resumo da composição química da madeira de *Eucalyptus globulus*

Neste anexo apresenta-se uma breve descrição da composição química sumária da madeira conhecida na bibliografia (tabela 15).

Tabela 15 Composição química sumária da madeira de E. globulus existente na bibliografia

Parâmetro	%(m/m) ⁽¹⁾			
	Pereira e colaboradores (1988)[8]	Paula Pinto, (2000)[88]	Cadahía e colaboradores (1997)[105]	Freire e colaboradores (2006) [106]
Teor em Cinzas	0,4	0,3	-	
Extractáveis:				
Diclorometano				0,26
Etanol/Tolueno		2,2	-	
Etanol/H ₂ O (80:20, 24h)			3,40 - 3,86	
Solubilidade:				
Água quente		5,4		
Solução aquosa NaOH 1%		15,0		
Lenhina				
Insolúvel (Klason)	19,50	20,0		
Solúvel	3,6	2,2		
Compostos fenólicos totais %m_{EAG}/m_{Casca}			1,04 - 1,32	

Na tabela 16 apresenta-se a composição em açúcares conhecida para a madeira de *E. globulus*.

Tabela 16 Composição de açúcares existente na bibliografia para a madeira de E. globulus [88]

Monossacarídeo	%(m/m)
ramnose	0,28
arabinose	0,56
xilose	18,6
manose	0,52
galactose	0,58
glucose	66,6
ácidos urónicos (método de descarboxilação)	5,2
ácidos urónicos (método colorimétrico)	5,4

Anexo 2 Exemplos de curvas de calibração utilizadas

O teor de fenólicos totais e a actividade anti-oxidante foram determinados em equivalentes de ácido gálico e equivalentes de ácido ascórbico, respectivamente. Para tal, foram construídas rectas de calibração com diferentes concentrações de ácido gálico (figura 16) ou ácido ascórbico (figura 17). Foi construído um gráfico de Absorvância vs Concentração e os pontos obtidos foram ajustados por regressão linear e determinou-se a equação da recta do tipo:

$$Abs = m \times [Concentração] + b \quad (6)$$

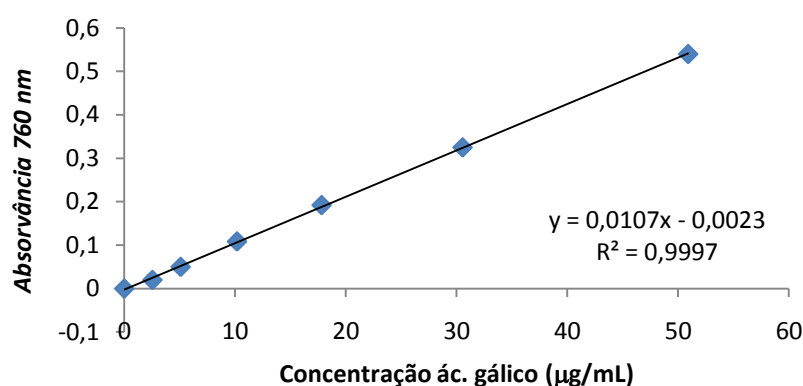


Figura 16 Exemplo de uma recta de calibração utilizada para a determinação do teor de fenólicos totais.

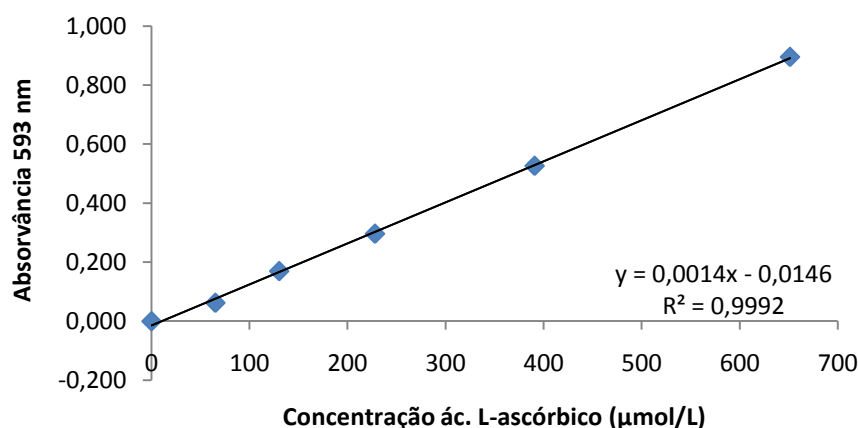


Figura 17 Exemplo de uma recta de calibração utilizada para a determinação da actividade anti-oxidante de redução do ião ferro (FRAP).

Anexo 3 Análise de açúcares e espectros de massa obtidos para o estudo do extracto da metanólise

De forma a complementar os gráficos apresentados nas figuras 8 e 9 (secção 4.1.2) apresenta-se a seguinte tabela 17 com os resultados obtidos para a hidrólise ácida com H_2SO_4 (5,5 h) e metanólise (3 h, 4 h, 6 h, 8 h e 24 h). Os ensaios foram efectuados em duplicado e pode-se verificar pela tabela que estes apresentam boa repetibilidade.

Tabela 17 Composição média de monossacarídeos e ácidos urónicos presentes na casca de E. globulus, libertados por hidrólise ácida H_2SO_4 e por metanólise ácida com diferentes tempos de reacção

Composto	Hidrólise ácida com H_2SO_4 % (m/m)	Metanólise ácida % (m/m)				
		3 h	4 h	6 h	8 h	24 h
arabinose	2,07 ± 0,09	1,31 ± 0,05	1,52 ± 0,06	1,77 ± 0,17	1,62 ± 0,19	1,63 ± 0,06
galactose	1,61 ± 0,10	1,84 ± 0,04	2,18 ± 0,12	2,20 ± 0,06	1,99 ± 0,10	2,07 ± 0,21
glucose	49,67 ± 2,18	1,54 ± 0,05	1,74 ± 0,09	2,02 ± 0,10	1,77 ± 0,16	2,28 ± 0,02
xilose	11,75 ± 0,64	7,91 ± 0,42	9,01 ± 0,42	9,21 ± 0,35	8,53 ± 0,88	10,36 ± 0,02
manose	n.d.	0,23 ± 0,01	0,29 ± 0,03	0,36 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,42 ± 0,11
ramnose	n.d.	0,25 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,33 ± 0,06	0,36 ± 0,10
Total	65,11	13,07	15,06	15,91	14,91	17,13
ácido acético	5,34 ± 0,30					
ácido galacturónico	n.d.	1,99 ± 0,03	2,30 ± 0,06	2,57 ± 0,04	2,45 ± 0,09	3,23 ± 0,10
ácido 4-O-metil-glucurónico	n.d.	1,37 ± 0,02	1,60 ± 0,06	1,58 ± 0,03	1,52 ± 0,05	2,31 ± 0,12

Nota: Os resultados são expressos em massa de composto por massa de casca seca.

Seguidamente apresentam-se os espectros de massa utilizados para a identificação dos açúcares após 4 h de metanólise de casca. Através de metanólise ácida em metanol anidro com HCl dos polissacarídeos ocorre a libertação de monossacarídeos ácidos e neutros como metilglicosídeos [99]. Neste processo são geradas diferentes formas para cada açúcar: formas α -, β -, piranosídeo e furanosídeo. As proporções entre cada uma das formas do açúcar e os respectivos tempos de retenção são característicos para cada açúcar.

Neste trabalho, os açúcares foram identificados com base nos espectros de massa dos derivados trimetilsililados recorrendo a bibliografia existente e em alguns casos recorrendo aos espectros obtidos dos padrões após metanólise.

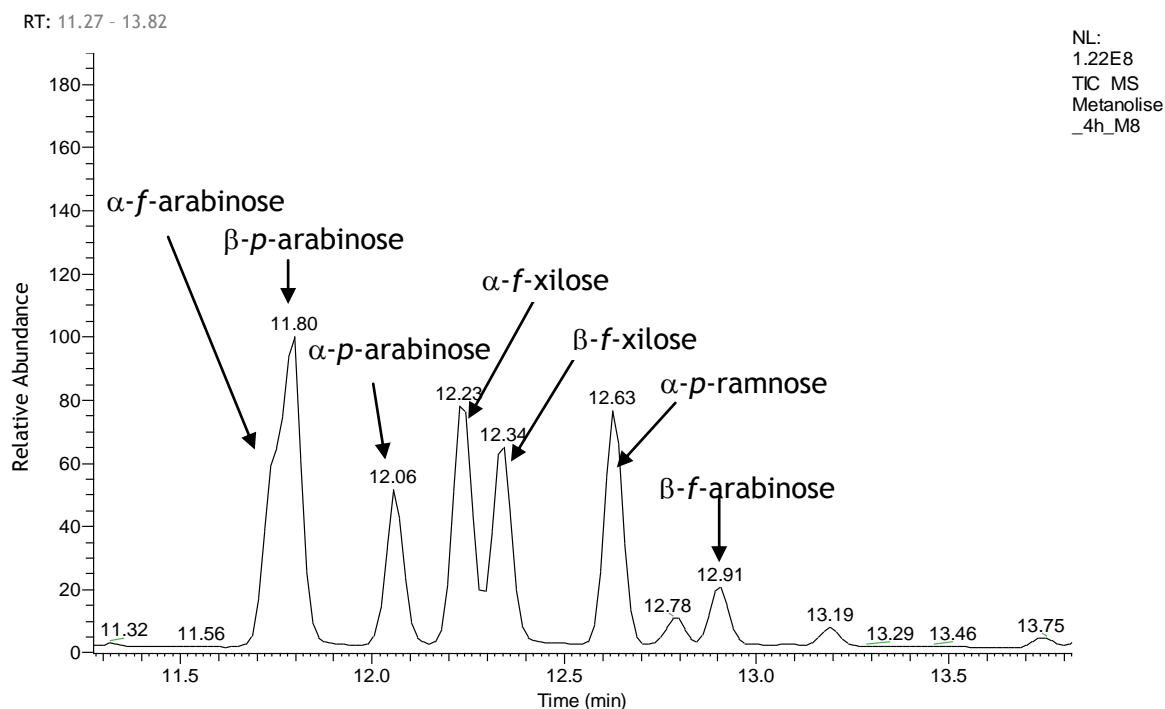


Figura 18 Cromatograma em GC-MS da metanólise da casca 4 horas (para tempos de retenção entre 11 min e 14 min, aproximadamente).

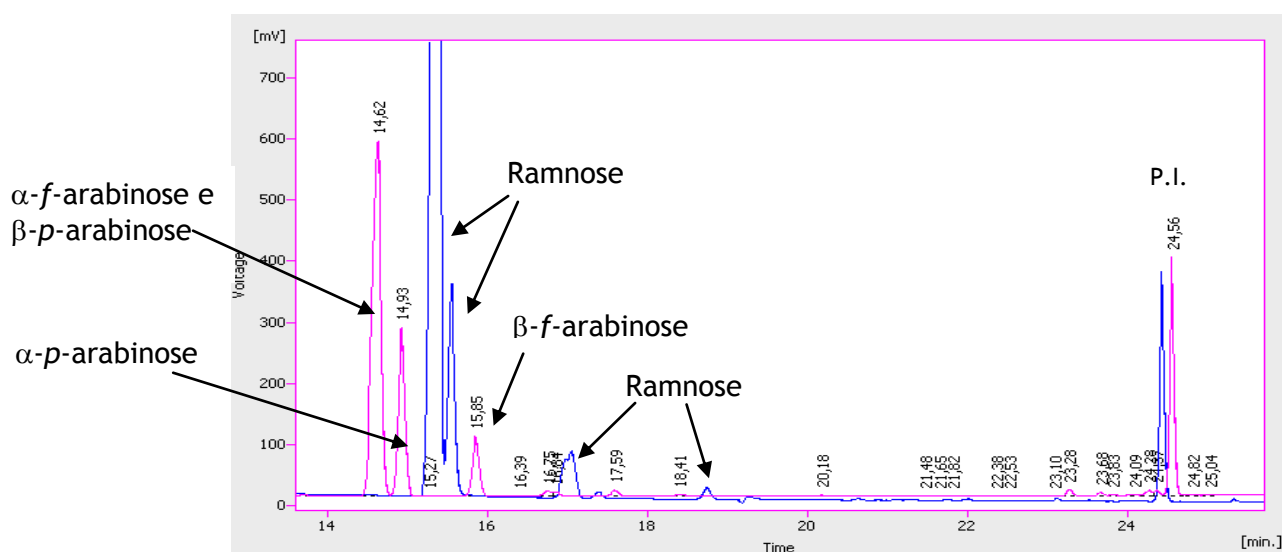


Figura 19 Sobreposição dos cromatogramas em GC-FID dos padrões arabinose e ramnose metilados (2 horas de metanólise) e sililados.

Metanolise_4h_M8 #420 RT: 11,73 AV: 1 NL: 1,97E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

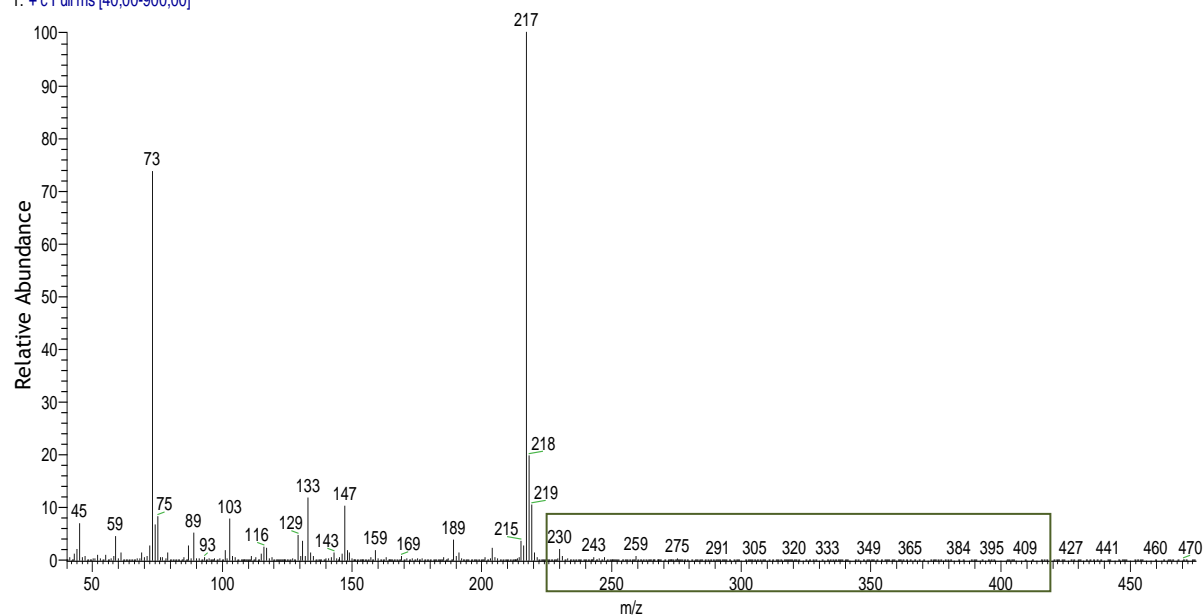


Figura 20 Espectro de massa para tempo de retenção 11,73 min correspondente a α -arabinofuranosídeo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #420 RT: 11,73 AV: 1 NL: 4,03E5
T: + c Full ms [40,00-900,00]

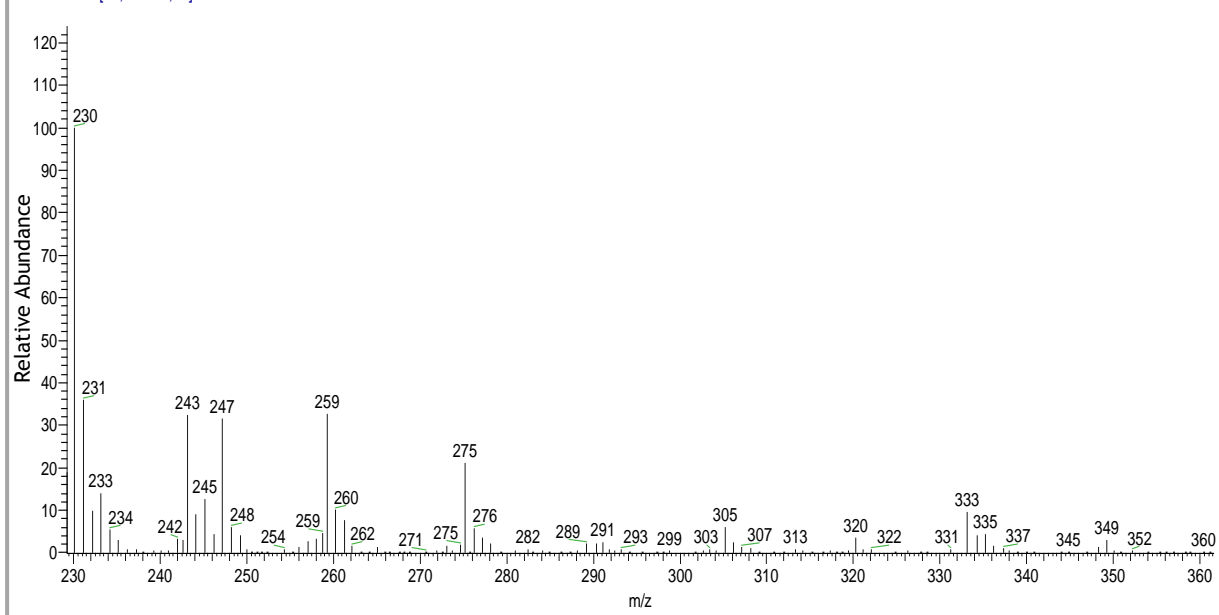


Figura 21 Ampliação 230 a 360 m/z do espectro relativo a α -arabinofuranosídeo de metilo trimetilsililado (figura 20).

Metanolise_4h_M8 #424 RT: 11,80 AV: 1 NL: 2,65E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

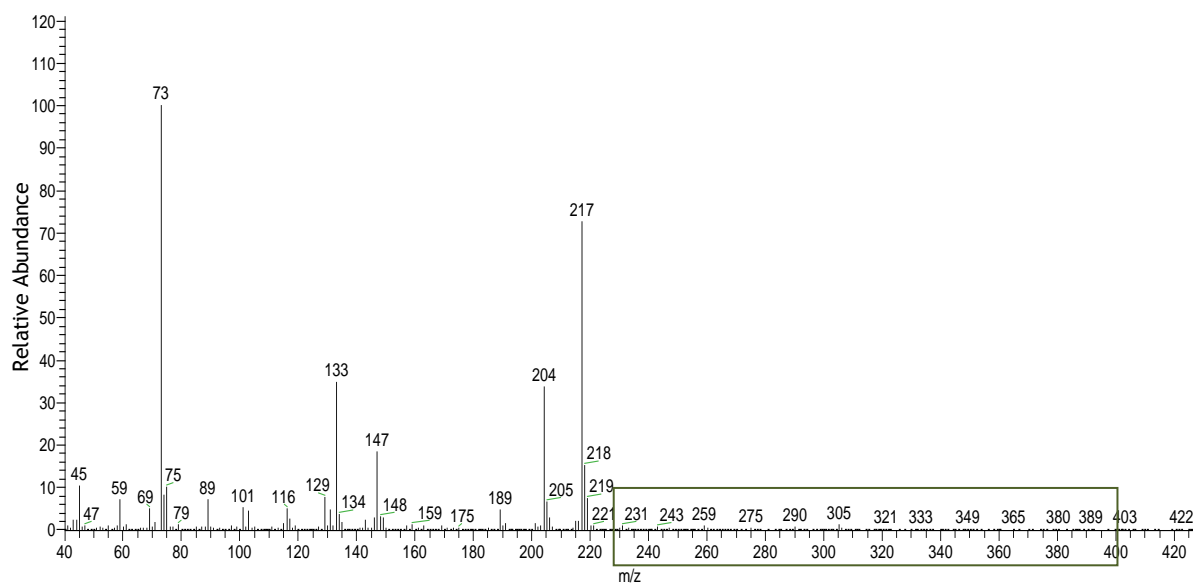


Figura 22 Espectro de massa para tempo de retenção 11,80 min correspondente a β -arabinopiranosídeo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #424 RT: 11,80 AV: 1 NL: 2,90E5
T: + c Full ms [40,00-900,00]

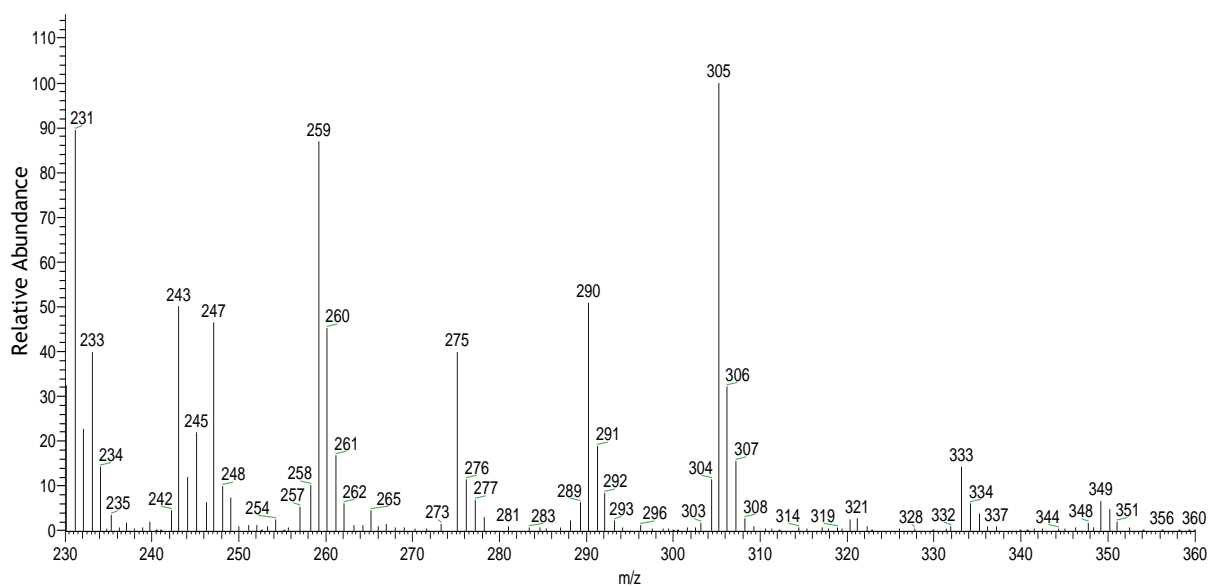


Figura 23 Ampliação 230 a 360 m/z do espectro relativo a β -arabinopiranosídeo de metilo trimetilsililado (figura 22).

Metanolise_4h_M8 #440 RT: 12,06 AV: 1 NL: 1,35E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

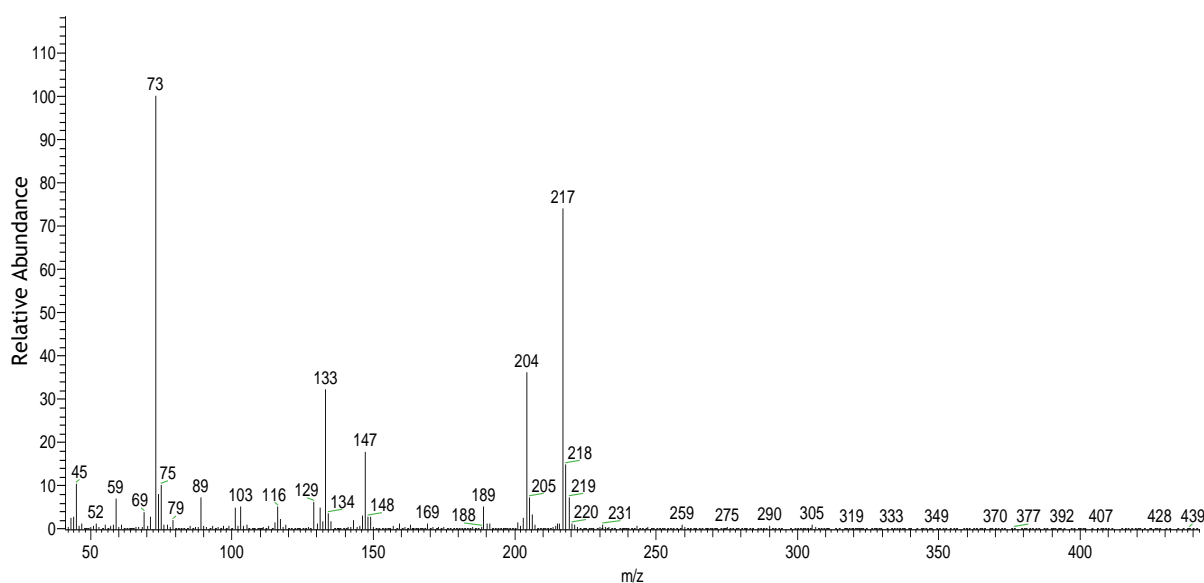


Figura 24 Espectro de massa para tempo de retenção 12,06 min correspondente a α -arabinopiranosídeo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #451 RT: 12,23 AV: 1 NL: 2,60E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

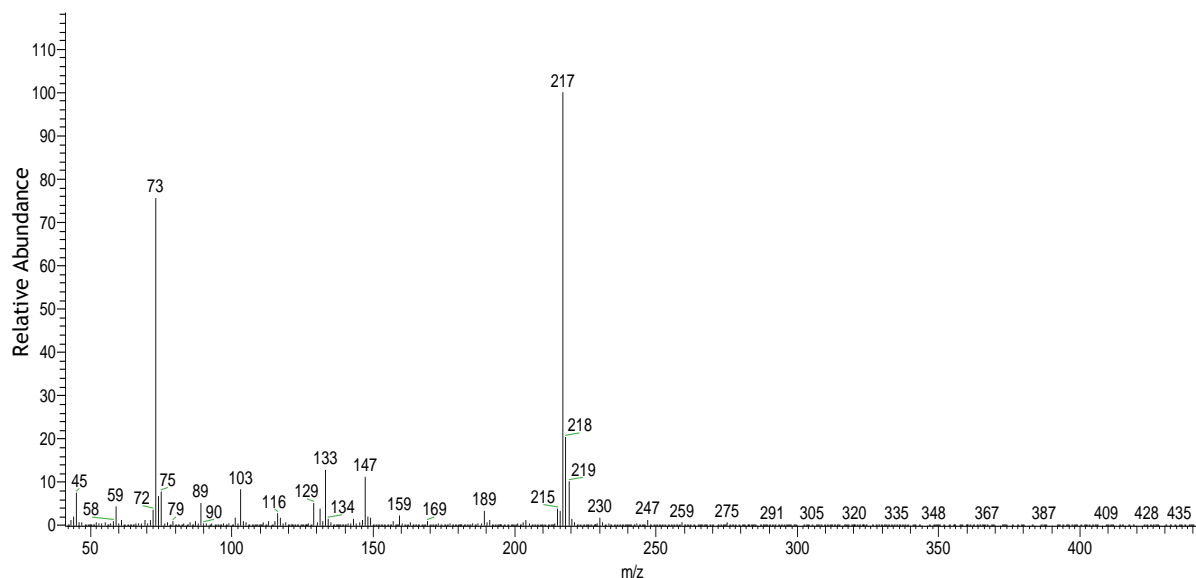


Figura 25 Espectro de massa para tempo de retenção 12,23 min correspondente a α -xilofuranosídeo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #458 RT: 12,34 AV: 1 NL: 2,09E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

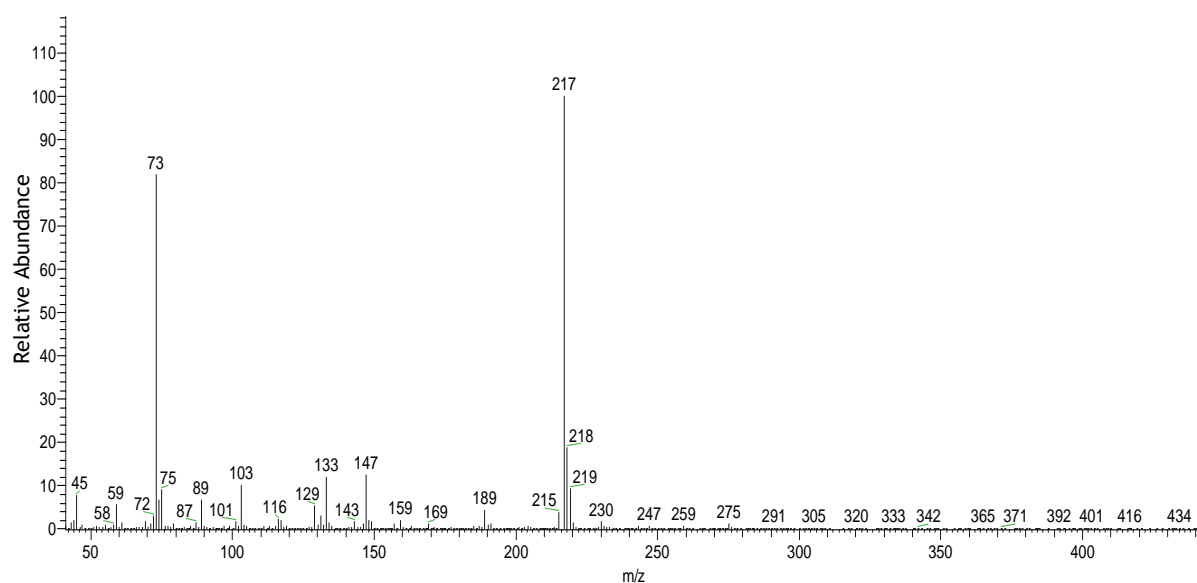


Figura 26 Espectro de massa para tempo de retenção 12,34 min correspondente a β -xilofuranosídeo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #476 RT: 12,63 AV: 1 NL: 1,93E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

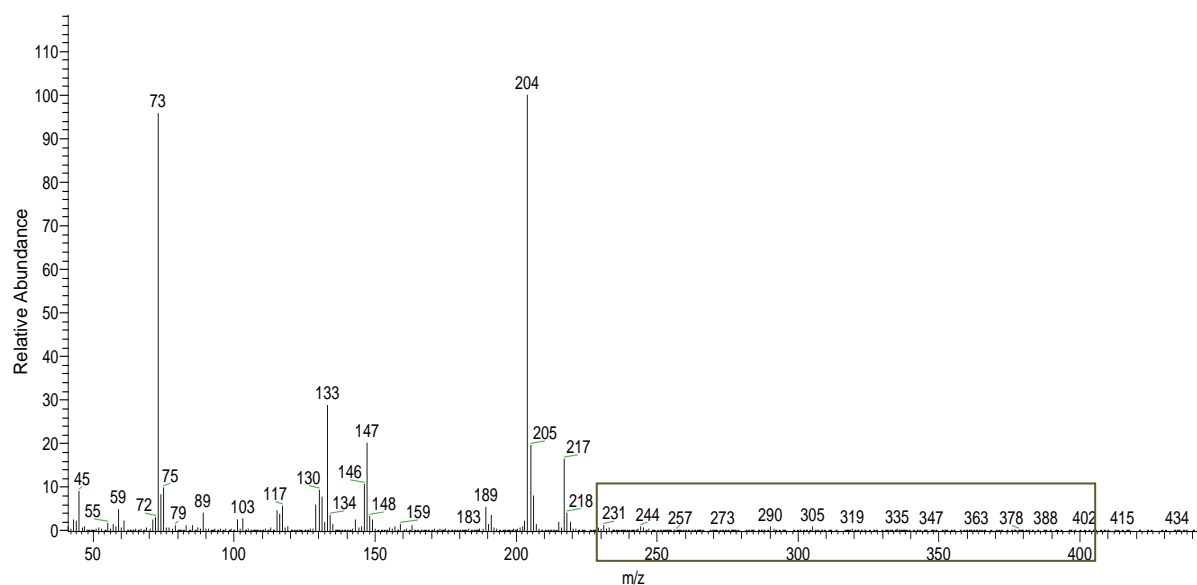


Figura 27 Espectro de massa para tempo de retenção 12,63 min correspondente a α -ramnopiranosídeo de metilo trimetilsililado.

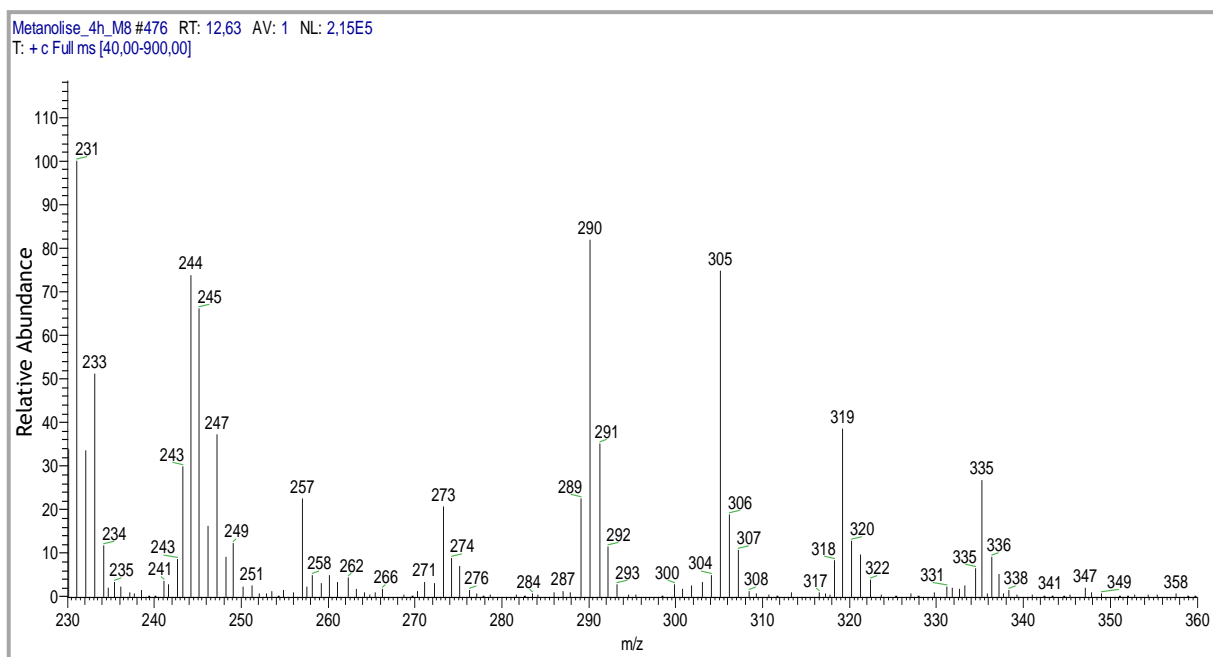


Figura 28 Ampliação 230 a 360 m/z do espectro relativo a α – ramnopiranosídeo de metilo trimetilsililado (figura 27).

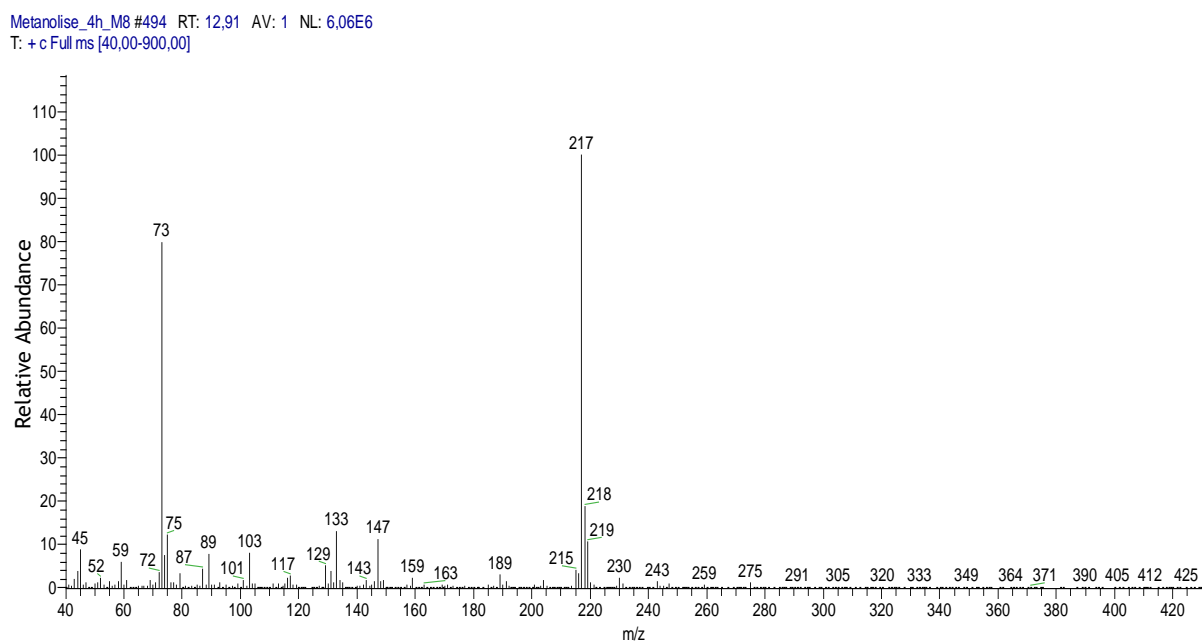


Figura 29 Espectro de massa para tempo de retenção 12,91 min correspondente a β -arabinofuranosídeo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #553 RT: 13,85 AV: 1 NL: 6,62E5
T: + c Full ms [40,00-900,00]

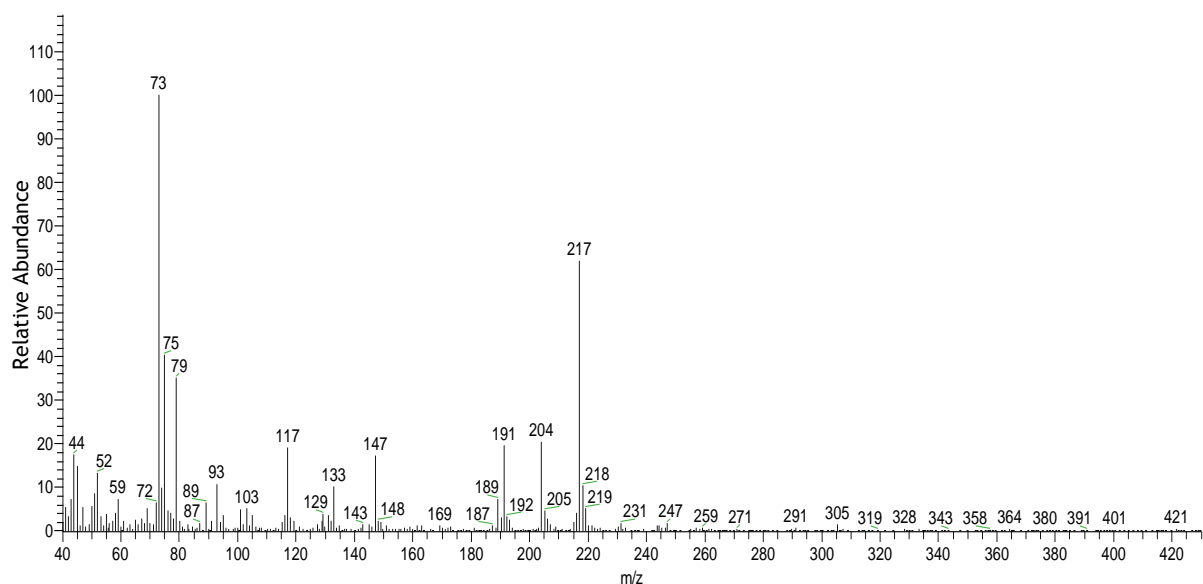


Figura 30 Espectro de massa para tempo de retenção 13,85 min correspondente a derivado de pentose não metilado trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #585 RT: 14,36 AV: 1 NL: 2,12E8
T: + c Full ms [40,00-900,00]

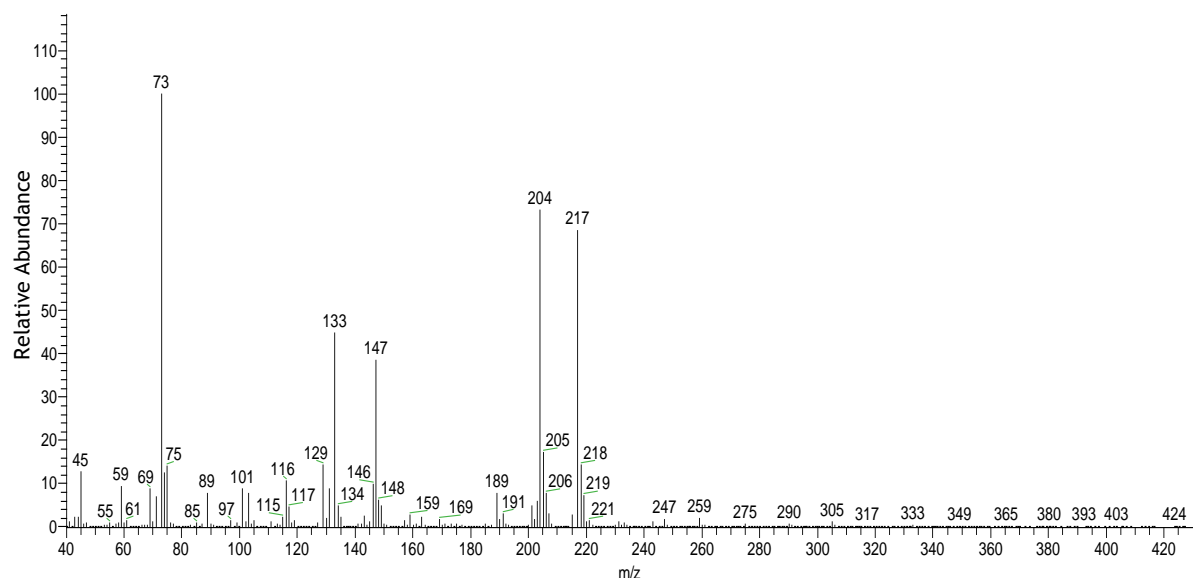


Figura 31 Espectro de massa para tempo de retenção 14,36 min correspondente a α -xilopiranosídeo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #618 RT: 14,88 AV: 1 NL: 1,75E8
T: + c Full ms [40,00-900,00]

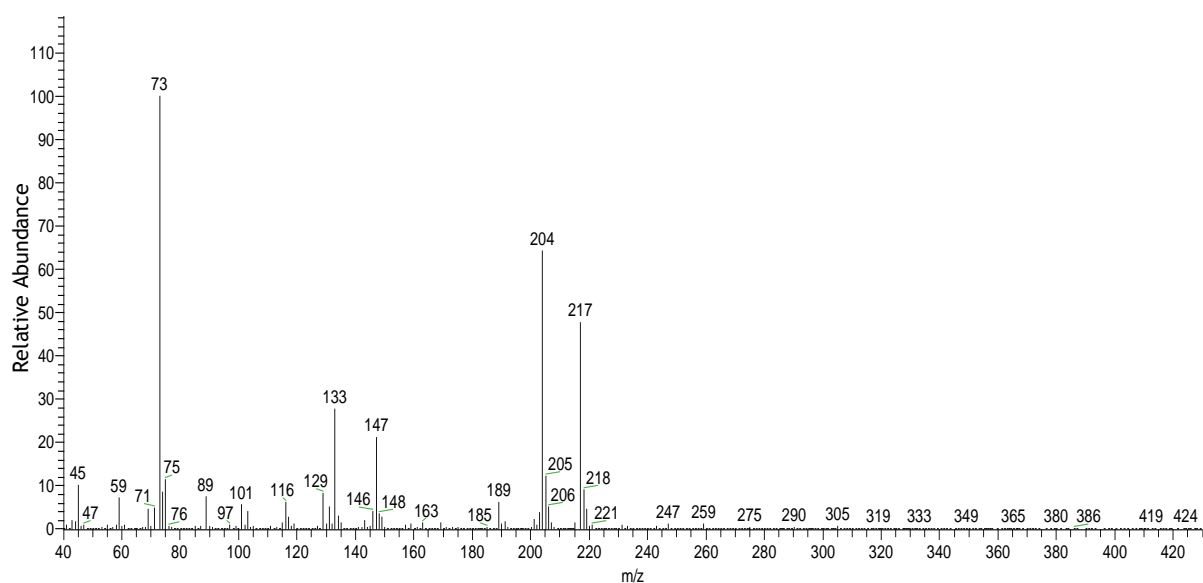


Figura 32 Espectro de massa para tempo de retenção 14,88 min correspondente a β -xilopiranosídeo de metilo trimetilsililado.

RT: 16.38 - 21.02

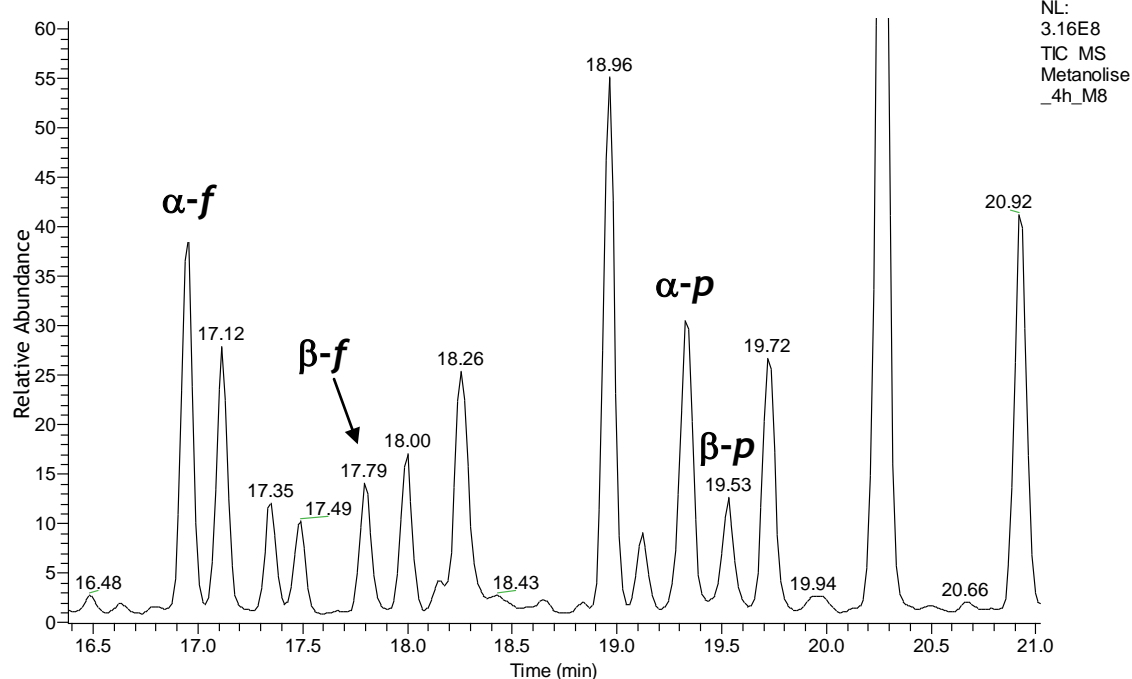


Figura 33 Cromatograma em GC-MS da metanólise da casca 4 horas (para tempos de retenção entre 16 min e 21 min, aproximadamente). Na figura indicam-se os tempos de retenção das diferentes formas metiladas do ácido galacturónico.

Metanolise_4h_M8 #690 RT: 16,02 AV: 1 NL: 4,89E6
T: + c Full ms [40,00-900,00]

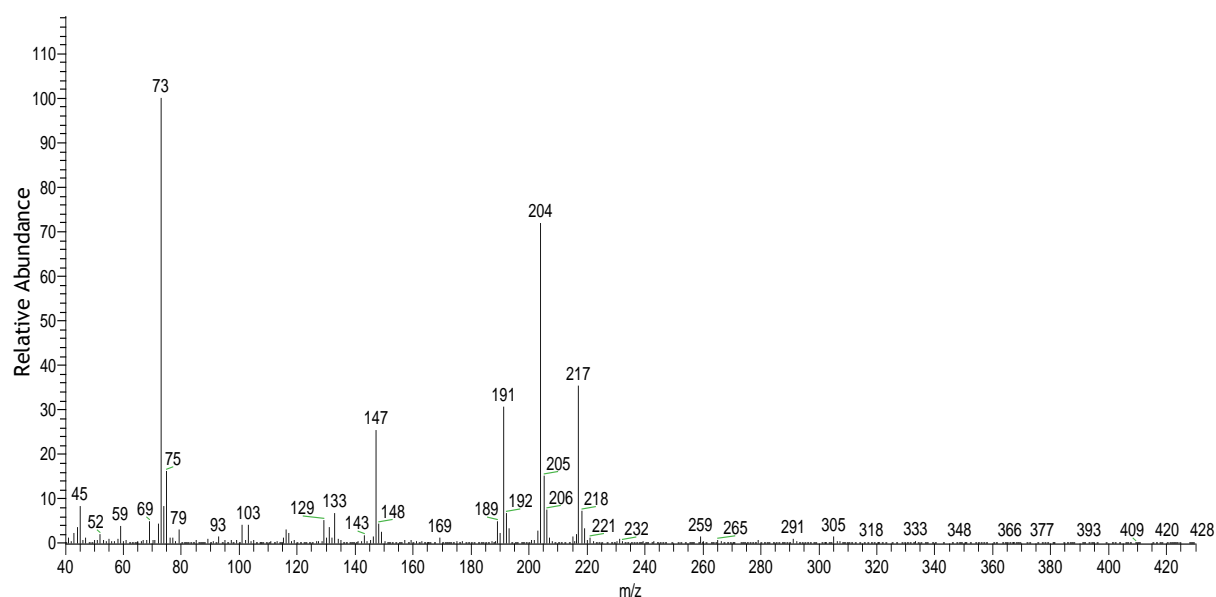


Figura 34 Espectro de massa para tempo de retenção 16,02 min correspondente a derivado de xilose não metilado.

Metanolise_4h_M8 #749 RT: 16,95 AV: 1 NL: 2,84E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

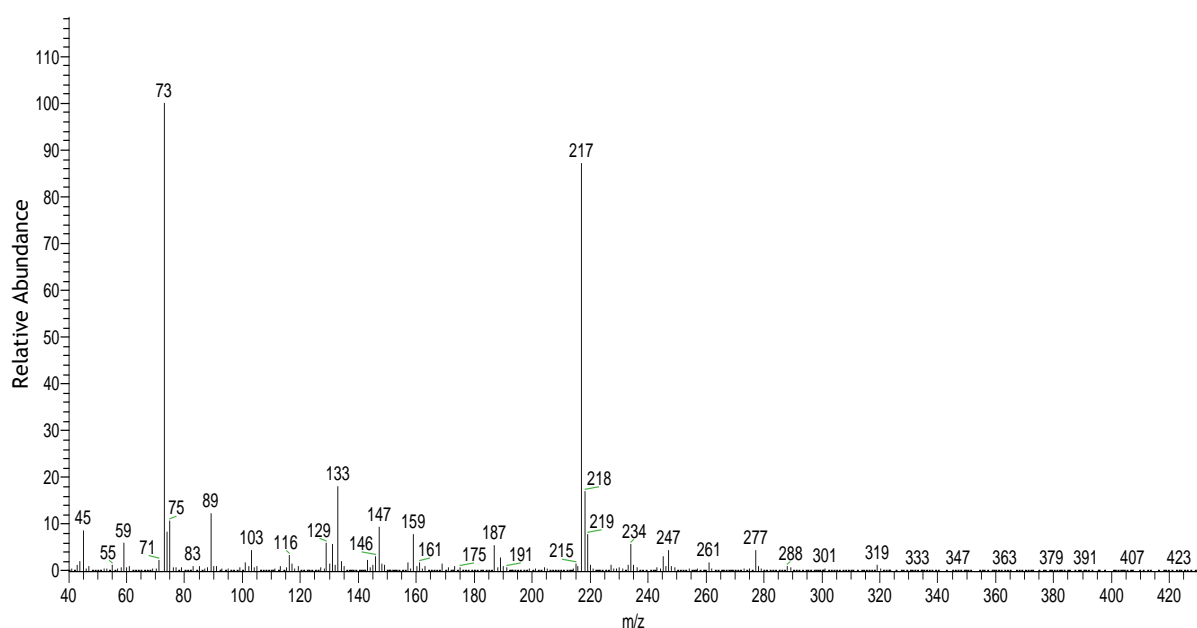


Figura 35 Espectro de massa para tempo de retenção 16,95 min correspondente a α -galacturonofuranosideo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #802 RT: 17,79 AV: 1 NL: 9,39E6
T: + c Full ms [40,00-900,00]

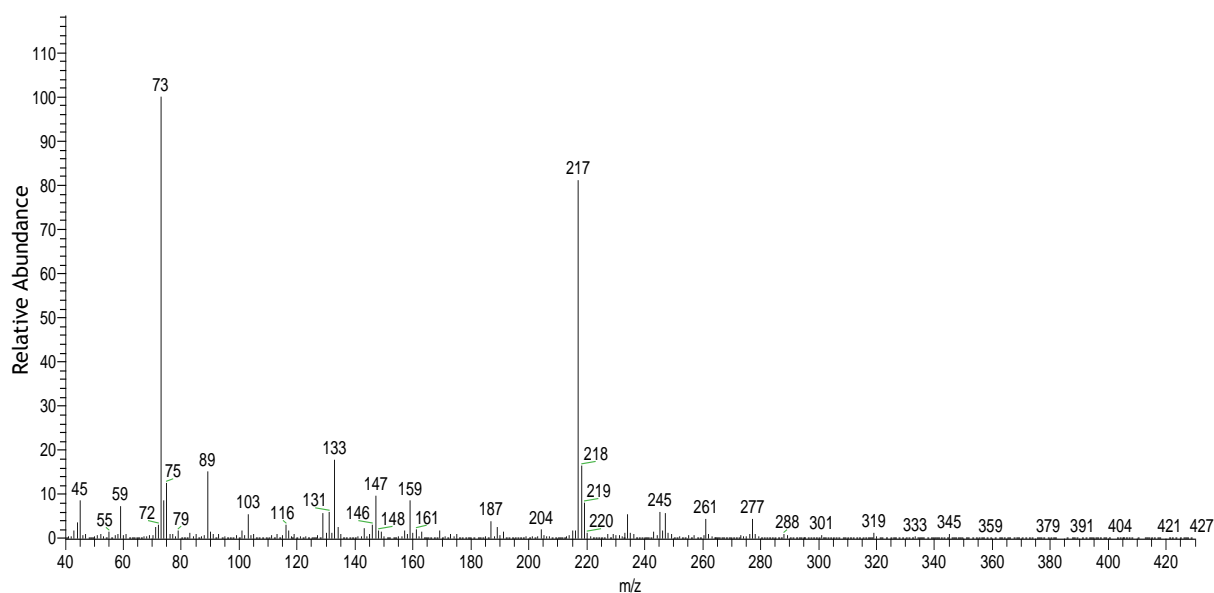


Figura 36 Espectro de massa para tempo de retenção 17,79 min correspondente a β -galacturonofuranosideo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #774 RT: 17,35 AV: 1 NL: 5,97E6
T: + c Full ms [40,00-900,00]

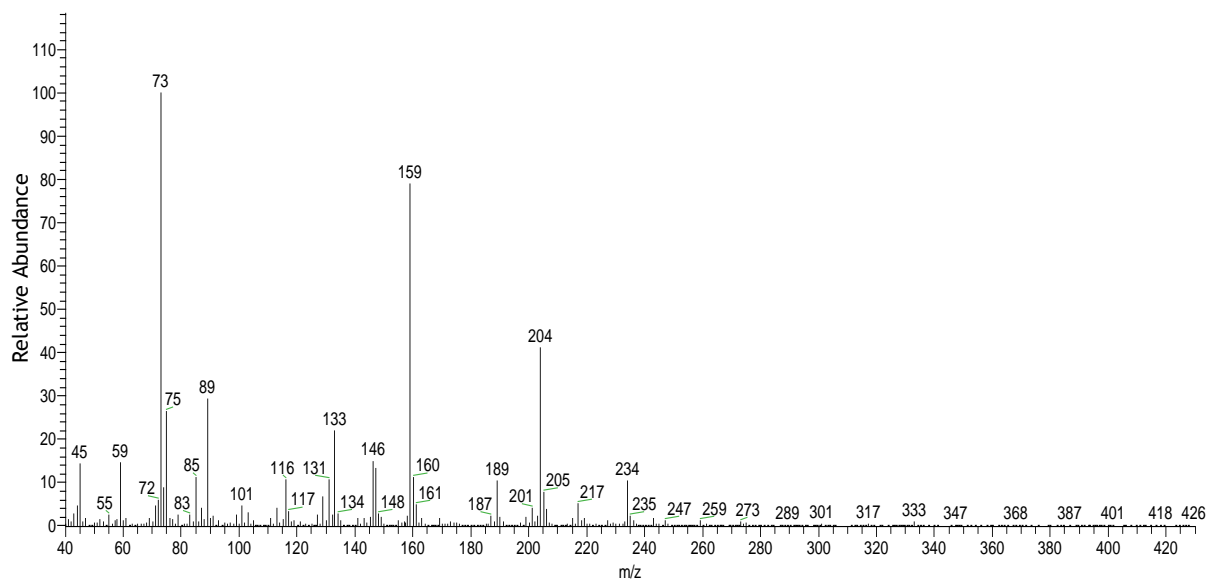


Figura 37 Espectro de massa para tempo de retenção 19,35 min correspondente a α -galacturonopiranosideo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #912 RT: 19,53 AV: 1 NL: 7,83E6
T: + c Full ms [40,00-900,00]

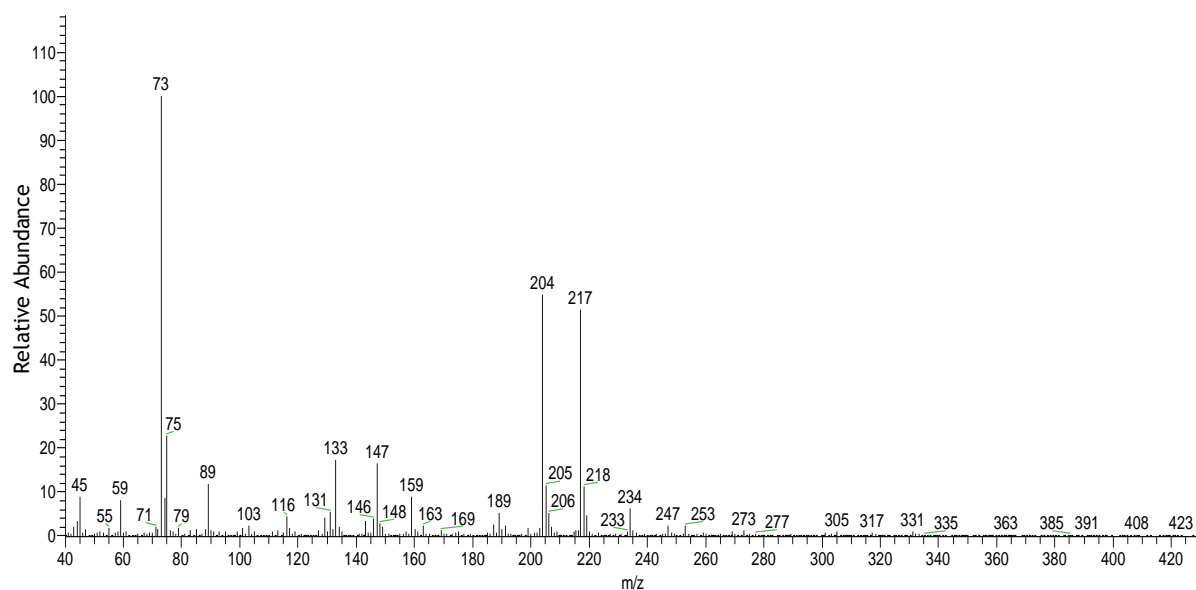


Figura 38 Espectro de massa para tempo de retenção 19,53 min correspondente a β -galacturonopiranosídeo de metilo trimetilsililado.

RT: 16,38 - 21,02

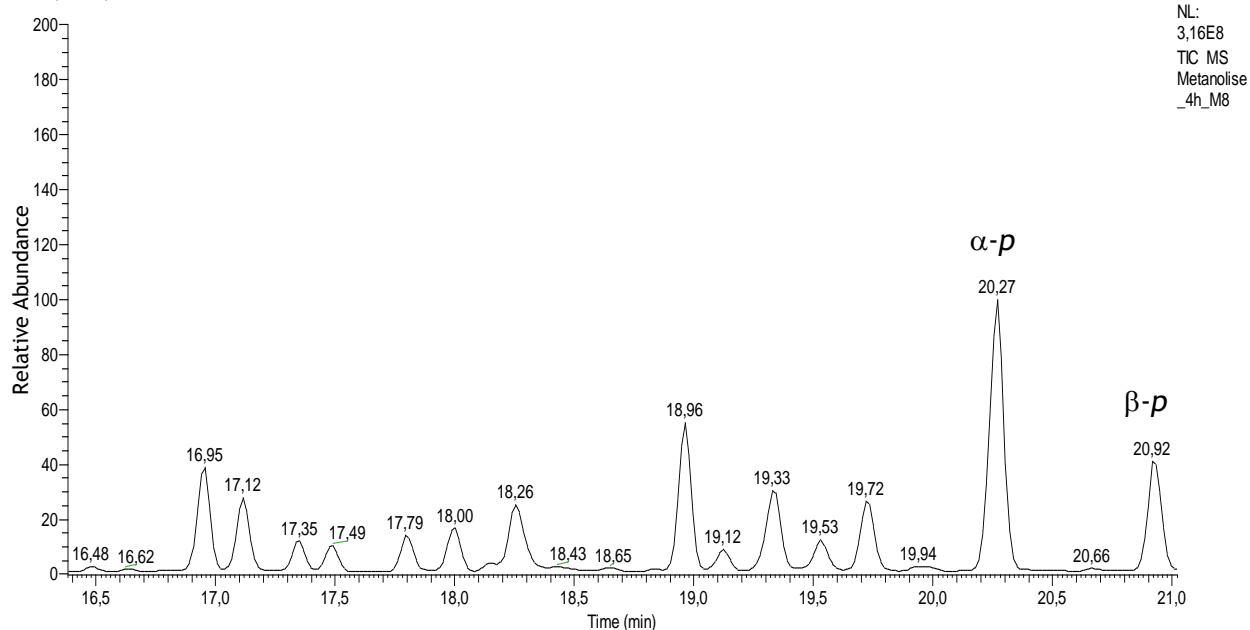


Figura 39 Cromatograma em GC-MS da metanólise da casca 4 horas (para tempos de retenção entre 16 min e 21 min, aproximadamente). Na figura indicam-se os tempos de retenção das formas metiladas da glucose.

Metanolise_4h_M8 #959 RT: 20,27 AV: 1 NL: 6,40E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

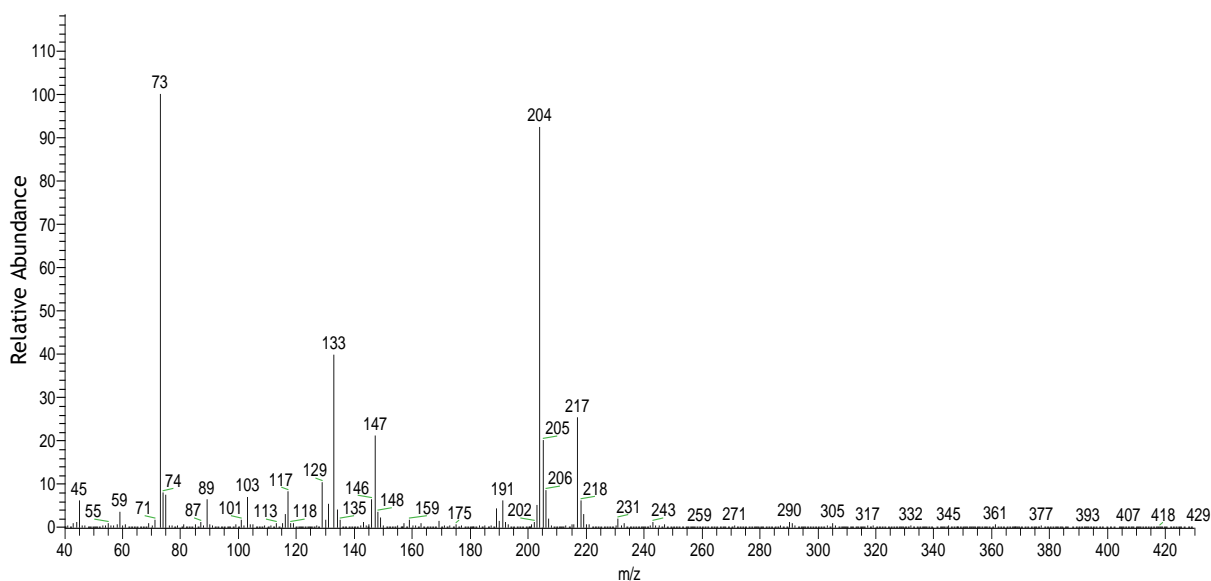


Figura 40 Espectro de massa para tempo de retenção 20,27 min correspondente a α -glucopiranosideo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #1000 RT: 20,92 AV: 1 NL: 2,71E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

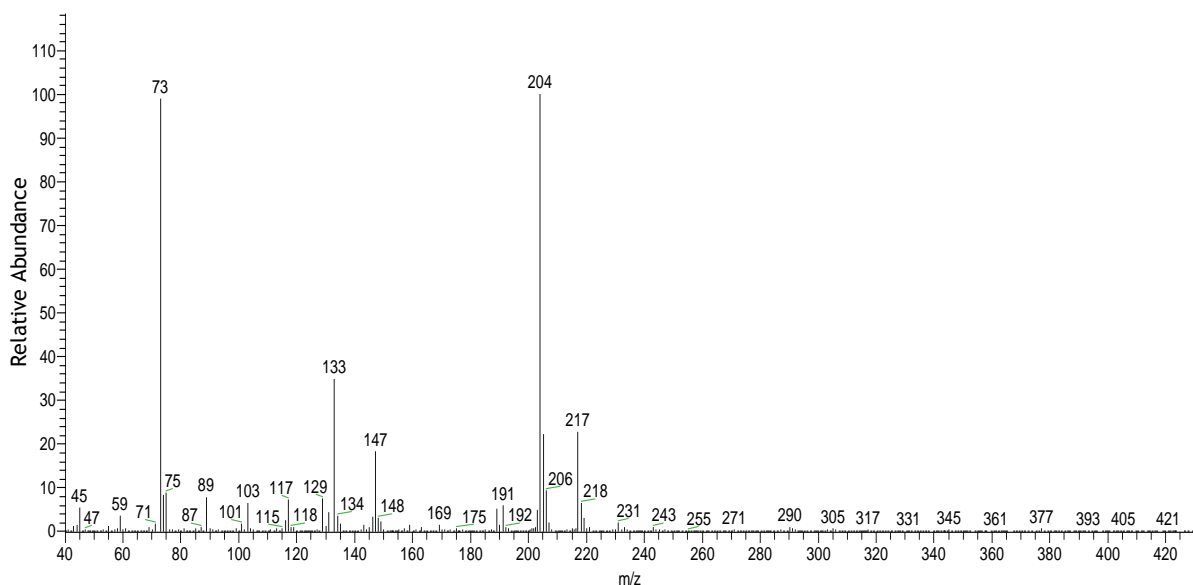


Figura 41 Espectro de massa para tempo de retenção 20,92 min correspondente a β -glucopiranosideo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #783 RT: 17,49 AV: 1 NL: 7,25E6
T: + c Full ms [40,00-900,00]

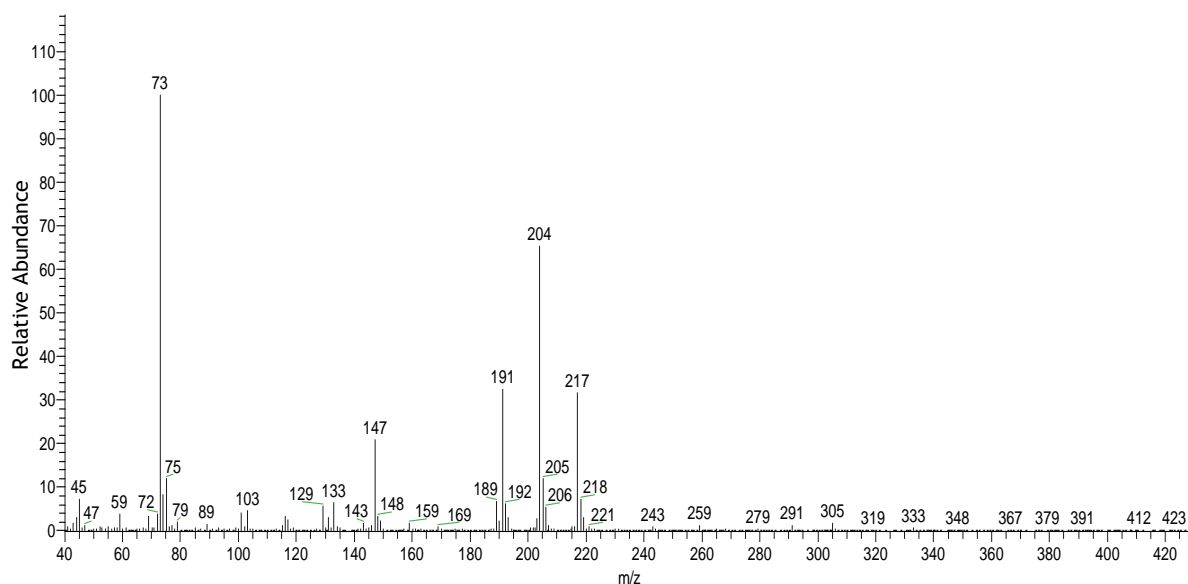


Figura 42 Espectro de massa para tempo de retenção 17,49 min correspondente a derivado de xilose não metilado trimetilsililado.

RT: 16.38 - 21.02

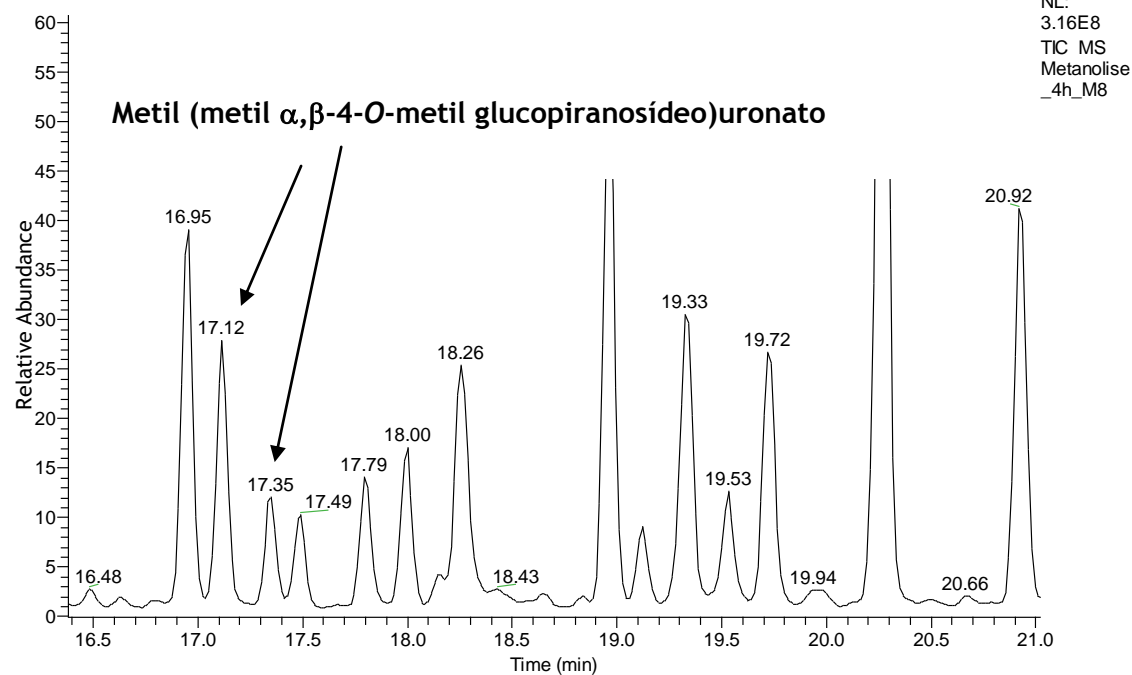


Figura 43 Ampliação do cromatograma GC-MS da metanólise da casca 4 horas (para tempos de retenção 16 min e 21 min). Na figura indica-se as formas metiladas de metil(metil α,β -4-O-metil glucopiranosídeo)uronato.

Metanolise_4h_M8 #759 RT: 17,12 AV: 1 NL: 1,41E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

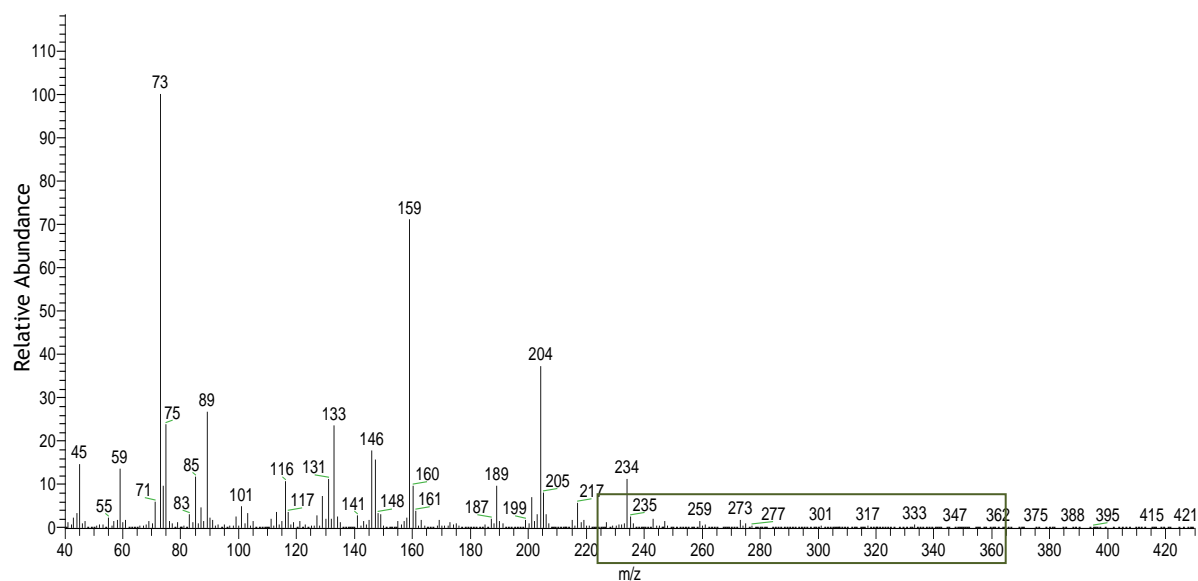


Figura 44 Espectro de massa para tempo de retenção 17,12 min correspondente a ácido 4-O-metil-glucurónico metilado trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #759 RT: 17,12 AV: 1 NL: 1,58E6
T: + c Full ms [40,00-900,00]

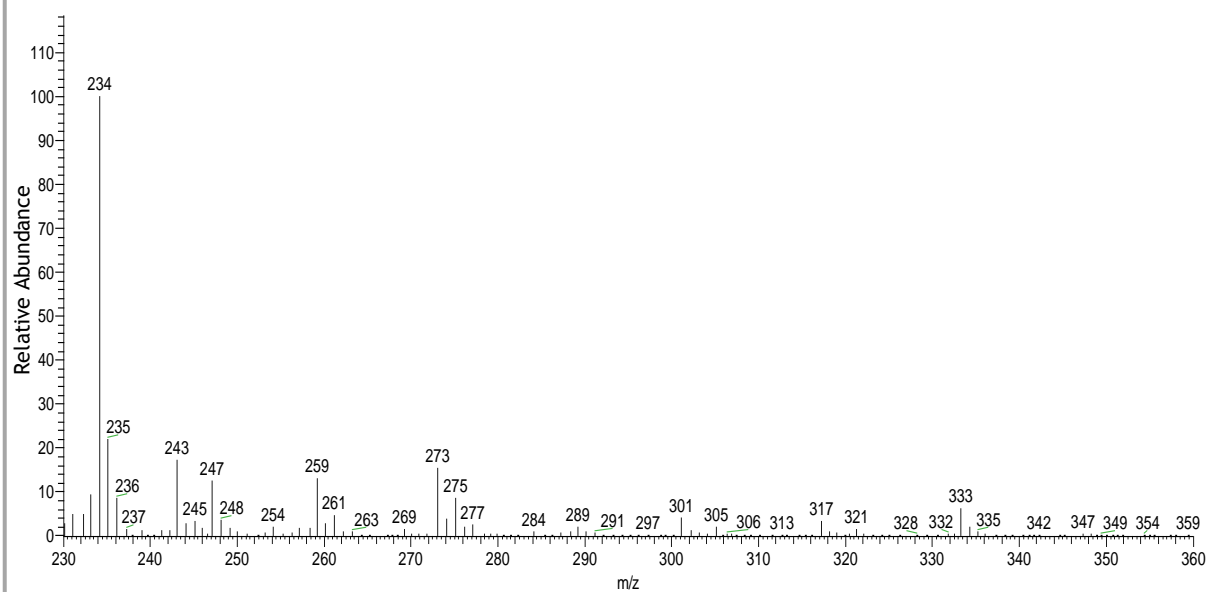


Figura 45 Ampliação 230 a 360 m/z do espectro relativo ácido 4-O-metil-glucurónico metilado trimetilsililado (figura 44).

Metanolise_4h_M8 #773 RT: 17,33 AV: 1 NL: 5,69E6
T: + c Full ms [40,00-900,00]

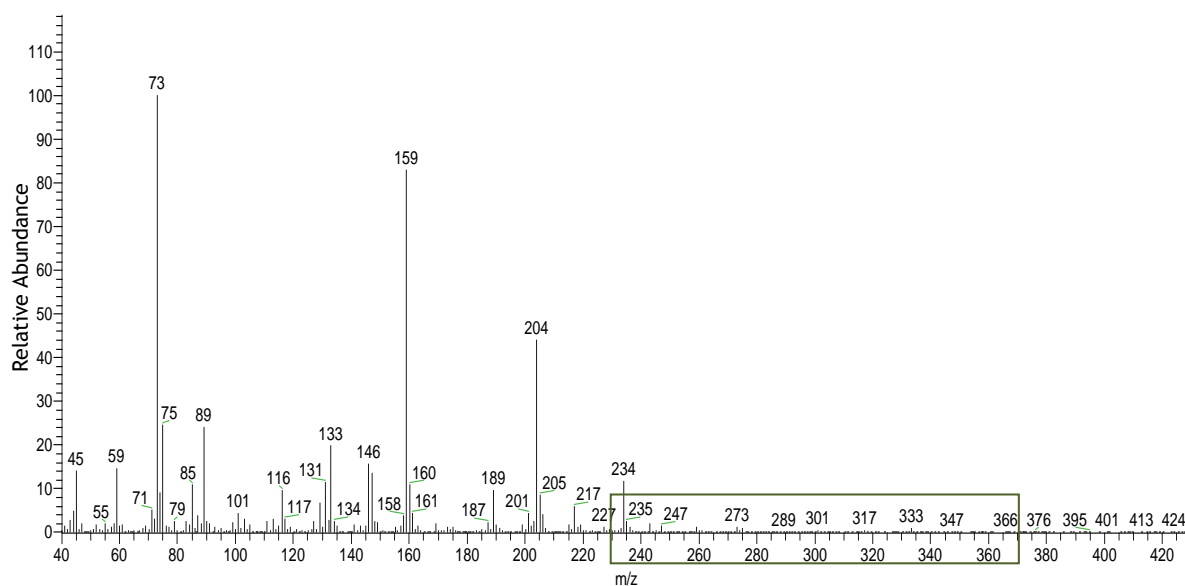


Figura 46 Espectro de massa para tempo de retenção 17,33 min correspondente a ácido 4-O-metil-glucurónico metilado trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #773 RT: 17,33 AV: 1 NL: 6,70E5
T: + c Full ms [40,00-900,00]

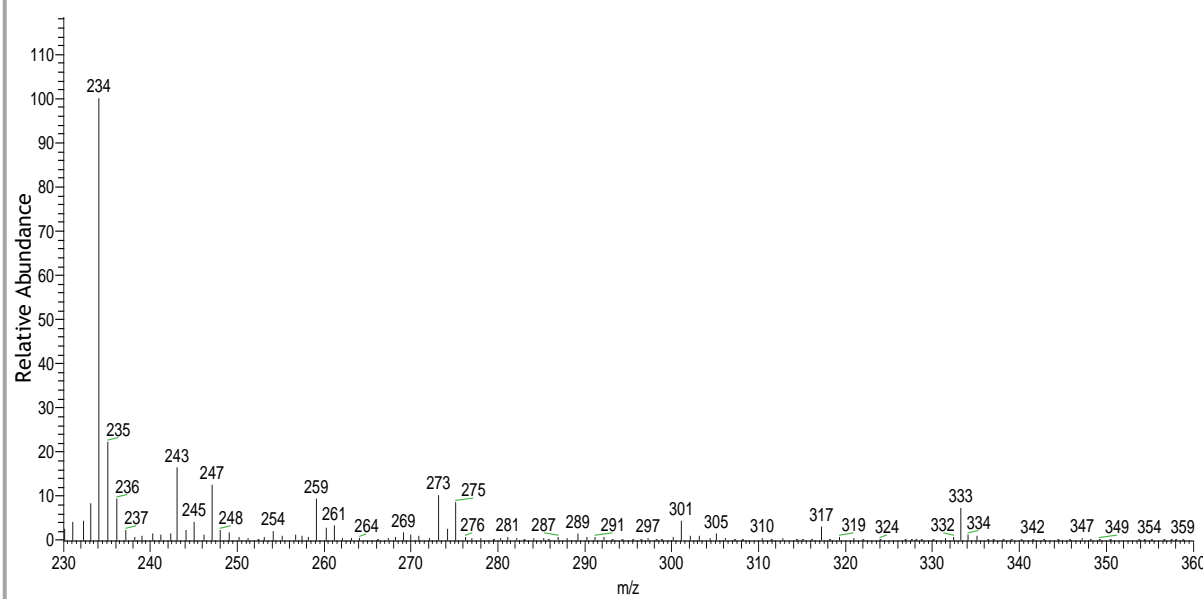


Figura 47 Ampliação 230 a 360 m/z do espectro relativo ácido 4-O-metil-glucurónico metilado trimetilsililado (figura 46).

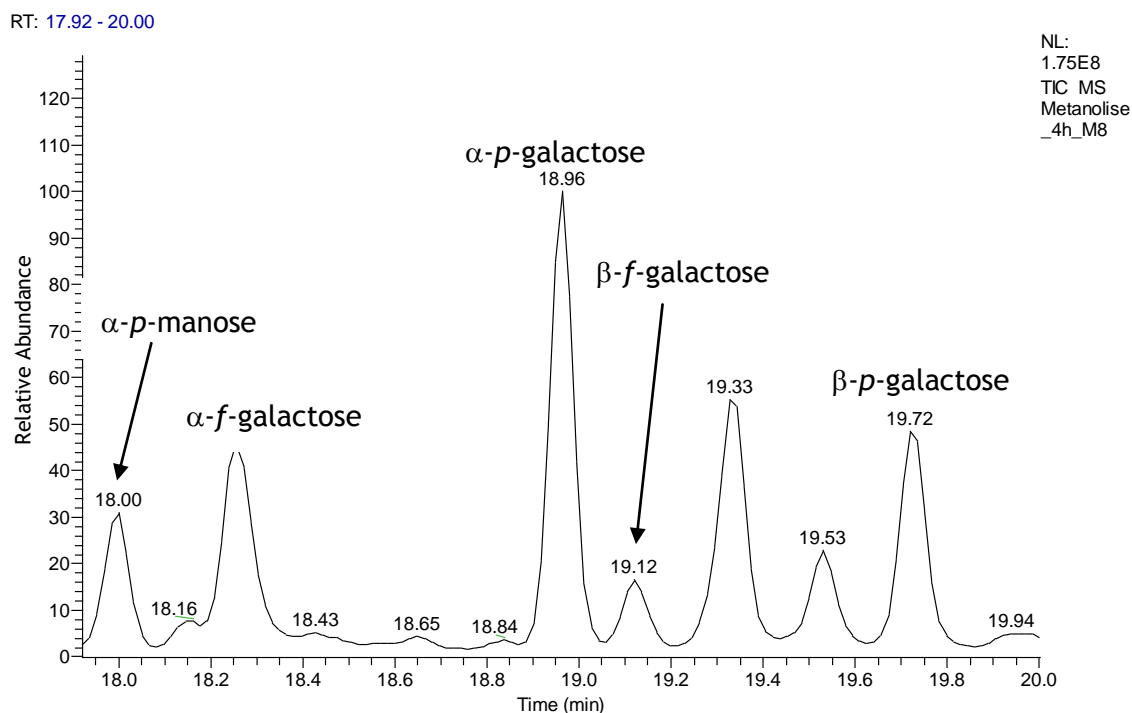


Figura 48 Cromatograma em GC-MS da metanólise da casca 4 horas (para tempos de retenção entre 18 min e 20 min, aproximadamente). Na figura indicam-se os tempos de retenção das formas metiladas da manose e galactose.

Metanolise_4h_M8 #815 RT: 18.00 AV: 1 NL: 1.05E7
T: + c Full ms [40.00-900.00]

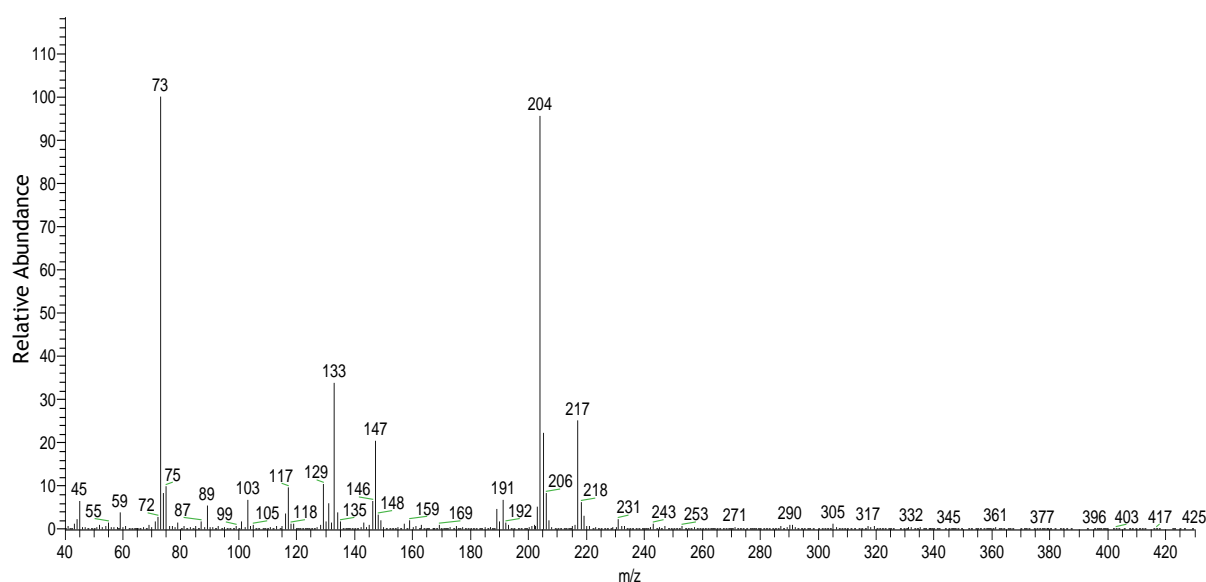


Figura 49 Espectro de massa para tempo de retenção 18,00 min correspondente a α -manopiranosídeo de metilo trimetilsililado.

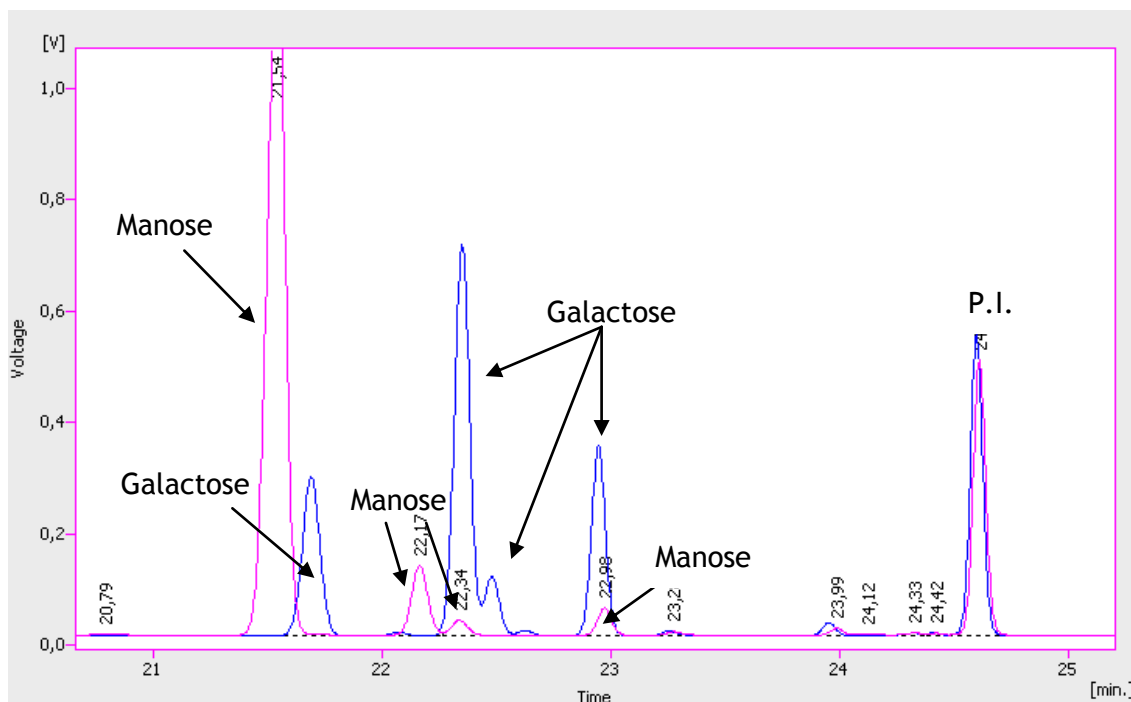


Figura 50 Sobreposição dos cromatograma em GC-FID dos padrões manose e galactose metilados (2 horas de metanólise) e sililados.

Metanolise_4h_M8 #831 RT: 18,26 AV: 1 NL: 1,70E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

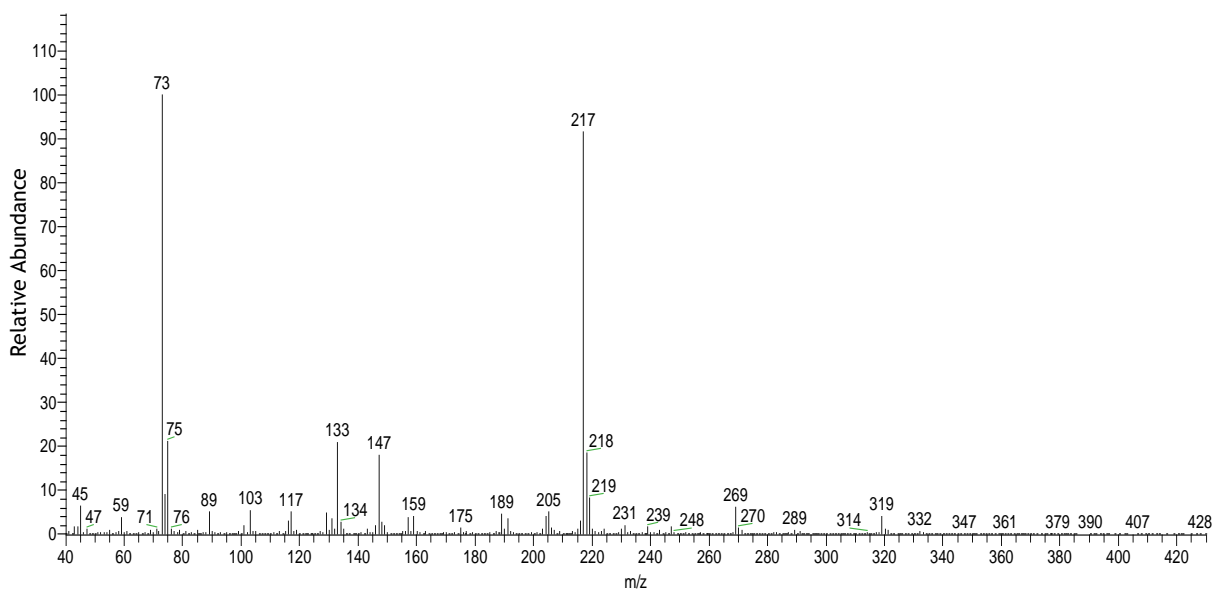


Figura 51 Espectro de massa para tempo de retenção 18,26 min correspondente a α -galactofuranosideo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #876 RT: 18,96 AV: 1 NL: 3.78E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

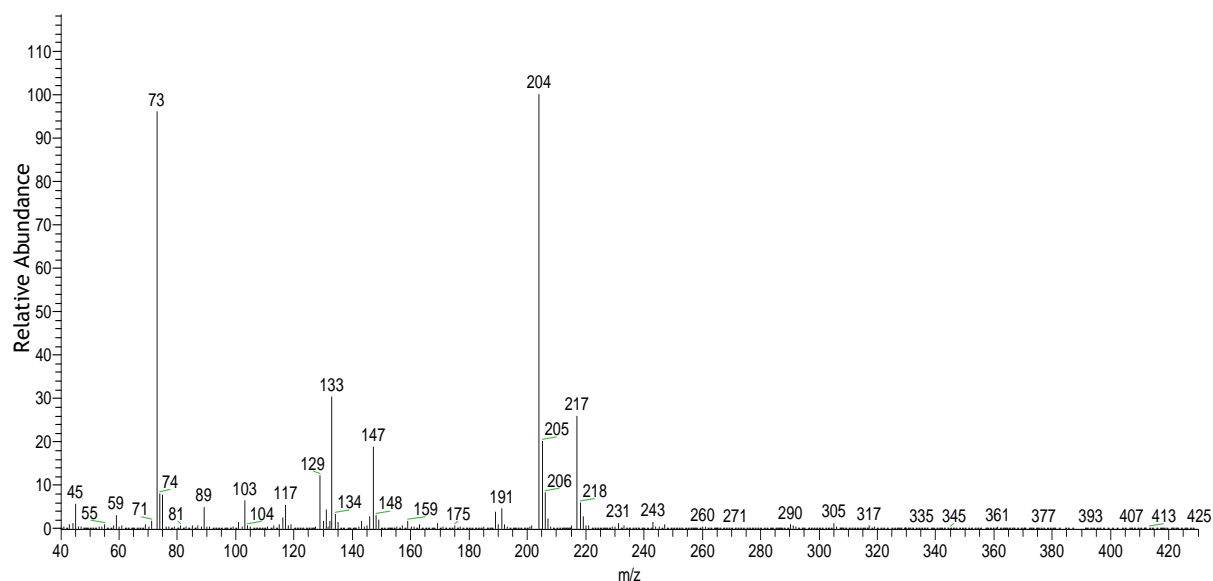


Figura 52 Espectro de massa para tempo de retenção 18,96 min correspondente a α -galactopiranosideo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #886 RT: 19,12 AV: 1 NL: 6.03E6
T: + c Full ms [40,00-900,00]

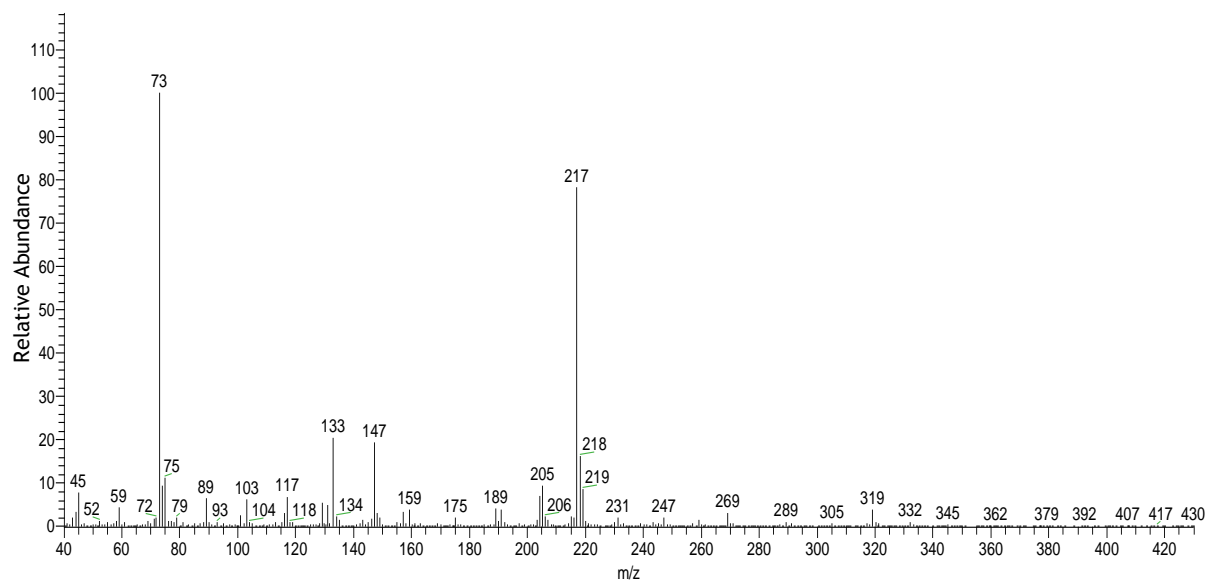


Figura 53 Espectro de massa para tempo de retenção 19,12 min correspondente a β -galactofuranosideo de metilo trimetilsililado.

Metanolise_4h_M8 #924 RT: 19,72 AV: 1 NL: 1,70E7
T: +c Full ms [40,00-900,00]

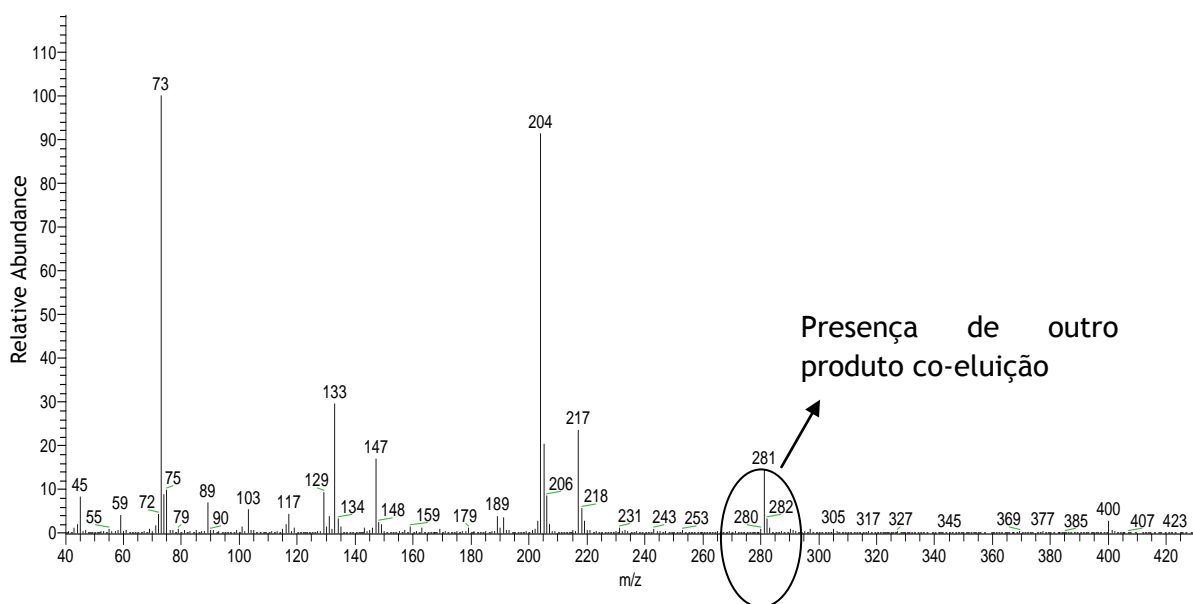


Figura 54 Espectro de massa para tempo de retenção 19,72 min correspondente a β -galactopiranosídeo de metilo trimetilsililado.

RT: 21.40 - 30.61

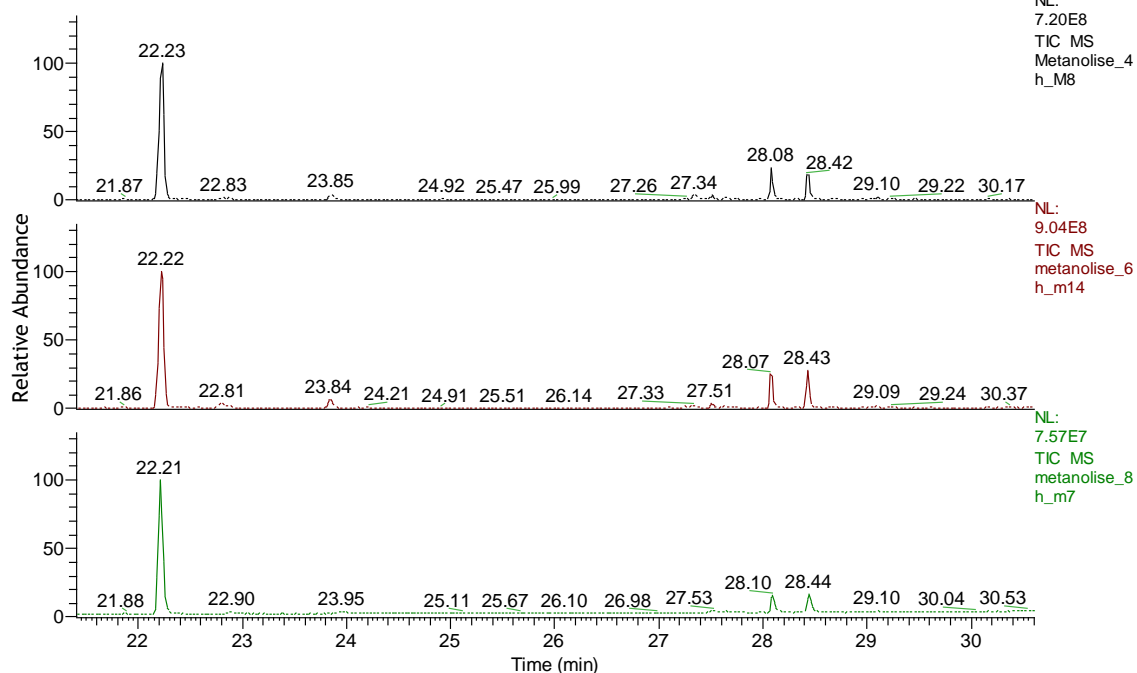


Figura 55 Cromatograma em GC-MS da metanólise da casca 4 h, 6h e 8 h (para tempos de retenção entre 21 min e 30 min, aproximadamente).

Metanolise_4h_M8 #1455 RT: 28,08 AV: 1 NL: 2,86E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

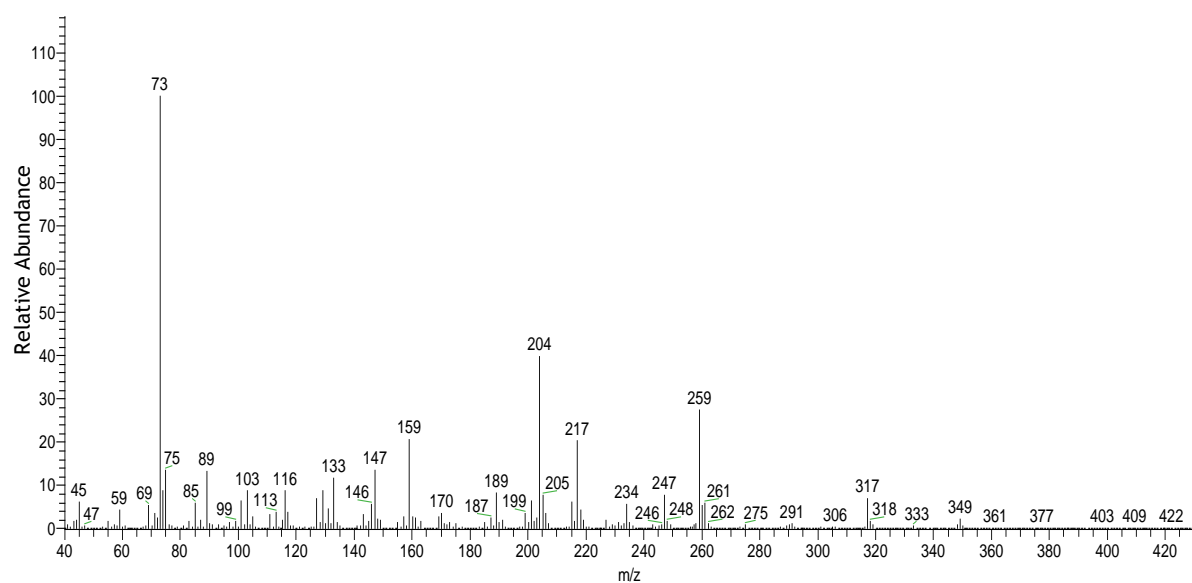


Figura 56 Espectro de massa para tempo de retenção 28,08 min atribuído a um dissacarídeo.

Metanolise_4h_M8 #1477 RT: 28,42 AV: 1 NL: 2,18E7
T: + c Full ms [40,00-900,00]

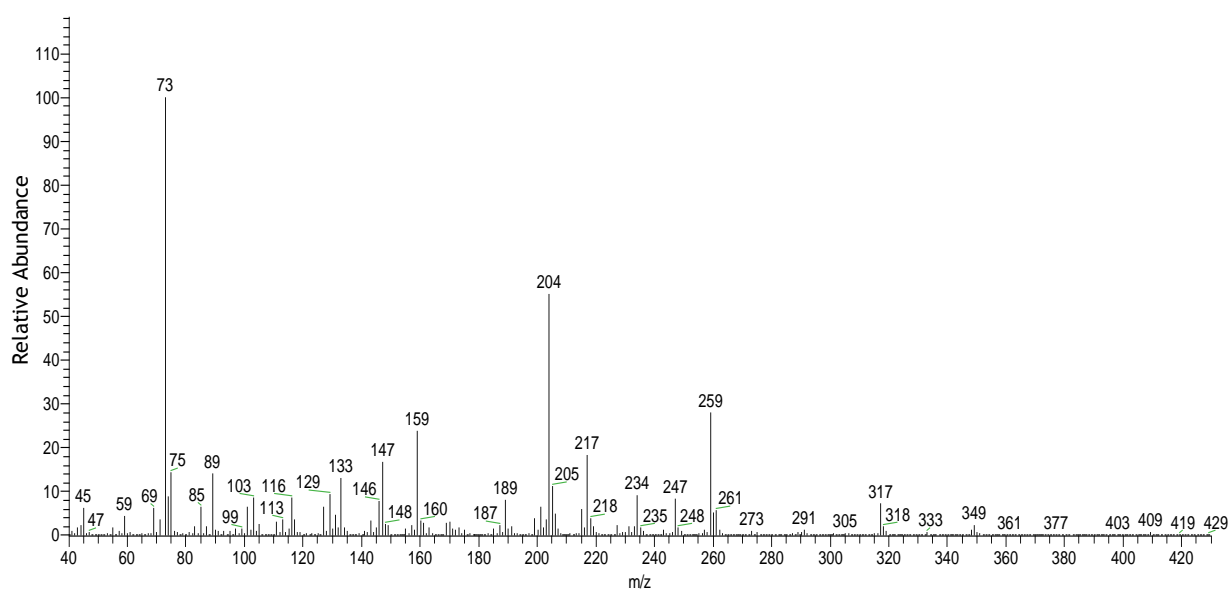


Figura 57 Espectro de massa para tempo de retenção 28,42 min atribuído a um dissacarídeo.

Anexo 4 Desenho experimental Box-Behnken

Neste anexo apresentam-se algumas informações secundárias utilizadas na aplicação da metodologia Box-Behnken. Na figura 58 apresenta-se uma imagem dos reactores M/K utilizados para realizar as diferentes extracções estudadas.



Figura 58 Reactores MK utilizados nas extracções de casca de Eucalyptus globulus (instalações do instituto RAIZ).

Na tabela 18 apresenta-se um quadro síntese com os parâmetros determinados para cada um dos modelos construídos com o respectivo desvio padrão. Na figura 59 apresenta-se um gráfico com a distribuição dos resíduos obtida para cada modelo. Por fim apresenta-se um quadro resumo com a análise ANOVA de cada modelo (tabelas 19-26).

Tabela 18 Quadro síntese com os parâmetros determinados para cada modelo construído e o respectivo desvio padrão

	Y ₁ Rendimento total % m/m _{casca}		Y ₂ Cinzas % m/m _{casca}		Y ₃ Rendimento TFC % m _{EAG} /m _{casca}	
	Coeficiente	Desv. Pad.	Coeficiente	Desv. Pad.	Coeficiente	Desv. Pad.
β_0	4,990	0,631	0,498	$2,367 \times 10^{-2}$	1,792	0,223
β_1	$1,050 \times 10^{-2}$	$3,580 \times 10^{-3}$	$2,076 \times 10^{-4}$	$1,964 \times 10^{-2}$	$2,427 \times 10^{-3}$	$8,629 \times 10^{-4}$
β_2	$9,191 \times 10^{-2}$	$1,027 \times 10^{-2}$	$1,904 \times 10^{-3}$	$5,637 \times 10^{-4}$	$1,822 \times 10^{-2}$	$2,476 \times 10^{-3}$
β_3	$-3,972 \times 10^{-2}$	$1,477 \times 10^{-3}$	$-6,331 \times 10^{-3}$	$8,103 \times 10^{-4}$	$1,553 \times 10^{-3}$	$3,560 \times 10^{-3}$
β_{12}	1,526	0,477	-	-	-	-
β_{23}	-1,431	0,477	$-6,443 \times 10^{-2}$	$2,619 \times 10^{-2}$	-	-
β_1^2	-	-	-	-	$-7,929 \times 10^{-2}$	0,120
β_2^2	1,685	0,494	-	-	$9,971 \times 10^{-2}$	0,120
β_3^2	-	-	-	-	-0,422	0,120
	Y ₄ Rendimento A. Anti-oxid. % mmol _{EAA} /g _{casca}		Y ₅ Selectividade TFC % m _{EAG} /m _{extracto}		Y ₆ Selectividade A. Anti-oxid. mmol _{EAA} /g _{extracto}	
	Coeficiente	Desv. Pad.	Coeficiente	Desv. Pad.	Coeficiente	Desv. Pad.
β_0	11,120	0,719	31,143	2,778	2,009	0,175
β_1	$1,376 \times 10^{-2}$	$4,074 \times 10^{-3}$	$1,327 \times 10^{-2}$	$1,031 \times 10^{-2}$	$7,686 \times 10^{-4}$	$6,505 \times 10^{-4}$
β_2	0,105	$1,169 \times 10^{-2}$	$3,959 \times 10^{-2}$	$2,959 \times 10^{-2}$	$1,34 \times 10^{-3}$	$1,867 \times 10^{-3}$
β_3	$9,000 \times 10^{-3}$	$1,681 \times 10^{-2}$	0,111	$4,254 \times 10^{-2}$	$7,369 \times 10^{-3}$	$2,683 \times 10^{-3}$
β_{12}	-	-	-3,121	1,375	-0,204	$8,674 \times 10^{-2}$
β_1^2	-	-	-1,501	1,431	$-7,772 \times 10^{-2}$	$9,029 \times 10^{-2}$
β_2^2	-	-	-3,785	1,431	-0,281	$9,029 \times 10^{-2}$
β_3^2	-2,444	0,562	-4,271	1,431	-0,271	$9,029 \times 10^{-2}$
	Y ₇ Proantocianidinas % m _{EEM} /m _{extracto}		Y ₈ Proantocianidinas % m _{EEM} /m _{casca}			
	Coeficiente	Desv. Pad.	Coeficiente	Desv. Pad.		
β_0	13,270	1,190	0,716	$6,754 \times 10^{-2}$		
β_1	$2,81 \times 10^{-3}$	$5,310 \times 10^{-3}$	$6,96 \times 10^{-4}$	$3,829 \times 10^{-4}$		
β_2	$1,52 \times 10^{-2}$	$1,524 \times 10^{-2}$	$5,22 \times 10^{-3}$	$1,099 \times 10^{-3}$		
β_3	$8,60 \times 10^{-2}$	$2,190 \times 10^{-2}$	$3,81 \times 10^{-3}$	$1,579 \times 10^{-3}$		
β_2^2	-2,60	0,735	-	-		
β_3^2	-3,36	0,735	$-2,60 \times 10^{-1}$	$5,284 \times 10^{-2}$		

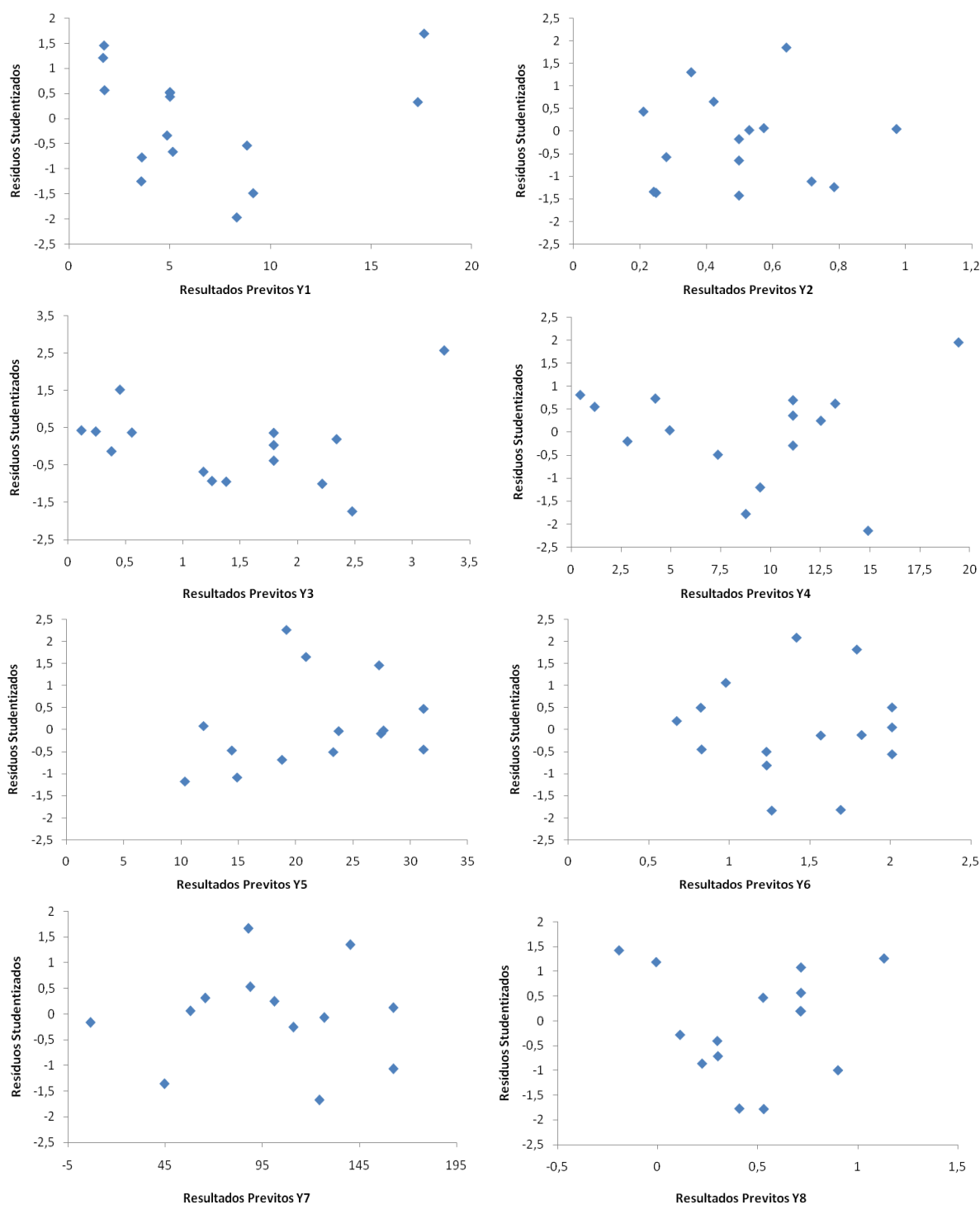


Figura 59 Resíduos studentizados para os modelos matemáticos construídos para Y_1 Rendimento de extracção total % m/m_{casca} ; Y_2 Cinzas % m/m_{casca} ; Y_3 Rendimento TFC % m_{EAG}/m_{casca} ; Y_4 Rendimento actividade anti-oxidante FRAP % $mmol_{EAA}/g_{casca}$; Y_5 Selectividade TFC % $m_{EAG}/m_{extracto}$; Y_6 Selectividade actividade antio-oxidante FRAP $mmol_{EAA}/g_{extracto}$; Y_7 Selectividade proantocianidinas % $m_{EEM}/m_{extracto}$; Y_8 Rendimento proantocianidinas % m_{EEM}/m_{casca} .

Tabela 19 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta rendimento total de extracção % m/m_{casca}

Y_1	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor p	R^2 0,941
Modelo	353,708	6	58,951	21,124	0,0002	
Erro	22,326	8	2,791			
Total ajustado	376,034	14	26,860			
Variáveis						
Intersecção	174,281	1	174,281	65,449	<0,0001	
Tempo (x_1)	23,999	1	23,999	8,599	0,0189	
Temperatura (x_2)	223,450	1	223,450	80,068	<0,0001	
Concentração Etanol (x_3)	20,199	1	20,199	7,238	0,0275	
x_1x_2	28,541	1	28,541	10,227	0,0127	
x_1x_3	-	-	-	-	-	
x_2x_3	25,072	1	25,072	8,984	0,0171	
x_1^2	-	-	-	-	-	
x_2^2	32,447	1	32,447	11,627	0,0092	
x_3^2	-	-	-	-	-	
Verificação Modelo						
Efeitos principais	267,648	3	89,216			
Efeitos de Interacção	53,613	2	26,807	9,605	0,0075	
Efeitos Inter. e Quad.	32,447	1	32,447	11,627	0,0092	
Efeitos quadráticos	32,447	1	32,447	11,627	0,0092	
Erro	22,326	8	2,791			
Falta de ajuste						
Falta de ajuste	22,314	6	3,719	635,409	0,0016	
Erro puro	$1,171 \times 10^{-2}$	2	$5,853 \times 10^{-3}$			
Erro total	22,326	8	2,791			

Tabela 20 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta teor de cinzas % m/m_{casca}

Y ₂	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor p	R ² 0,888
Modelo	0,669	4	0,167	19,906	0,0001	
Erro	8,405x10⁻²	10	8,405x10⁻³			
Total ajustado	0,753	14	5,381x10⁻²			
Variáveis						
Intersecção	3,713	1	3,713	441,780	<0,0001	
Tempo (x ₁)	9,384x10 ⁻³	1	9,384x10 ⁻³	1,117	0,3155	
Temperatura (x ₂)	9,592x10 ⁻²	1	9,592x10 ⁻²	11,413	<0,0070	
Concentração Etanol (x ₃)	0,513	1	0,513	61,046	<0,0001	
x ₁ x ₂	-	-	-	-	-	
x ₁ x ₃	-	-	-	-	-	
x ₂ x ₃	5,085x10 ⁻²	1	5,085x10 ⁻²	6,050	0,0337	
x ₁ ²	-	-	-	-	-	
x ₂ ²	-	-	-	-	-	
x ₃ ²	-	-	-	-	-	
Verificação Modelo						
Efeitos principais	0,618	3	0,206			
Efeitos de Interacção	5,085x10 ⁻²	1	5,085x10 ⁻²	6,050	0,0337	
Efeitos Inter. e Quad.	-	-	-	-	-	
Efeitos quadráticos	-	-	-	-	-	
Erro	8,405x10 ⁻²	10	8,405x10 ⁻³			
Falta de ajuste						
Falta de ajuste	6,545x10 ⁻²	8	8,183x10 ⁻³	0,880	0,6322	
Erro puro	1,859x10 ⁻²	2	9,297x10 ⁻³			
Erro total	8,405x10 ⁻²	10	8,405x10 ⁻³			

Tabela 21 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta rendimento em compostos fenólicos totais % m_{EAG}/m_{casca}

Y_3	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor p	R^2 0,905
Modelo	12,344	6	2,057	12,686	0,0010	
Erro	1,297	8	0,162			
Total ajustado	13,642	14	0,974			
Variáveis						
Intersecção	9,634	1	9,634	59,403	0,0001	
Tempo (x_1)	1,283	1	1,283	7,912	0,0227	
Temperatura (x_2)	8,784	1	8,784	54,165	0,0001	
Concentração Etanol (x_3)	$3,009 \times 10^{-2}$	1	$3,009 \times 10^{-2}$	0,190	0,6741	
$x_1 x_2$	-	-	-	-	-	-
$x_1 x_3$	-	-	-	-	-	-
$x_2 x_3$	-	-	-	-	-	-
x_1^2	$7,108 \times 10^{-2}$	1	$7,108 \times 10^{-2}$	0,438	0,5265	
x_2^2	0,112	1	0,112	0,693	0,4292	
x_3^2	2,011	1	2,011	12,400	0,0078	
Verificação Modelo						
Efeitos principais	10,098	3	3,366			
Efeitos de Interacção	-	-	-	-	-	
Efeitos Inter. e Quad.	-	-	-	-	-	
Efeitos quadráticos	2,246	3	0,749	4,616	0,0372	
Erro	1,297	8	0,162			
Falta de ajuste						
Falta de ajuste	1,267	6	0,211	14,122	0,0676	
Erro puro	$2,992 \times 10^{-2}$	2	$1,496 \times 10^{-2}$			
Erro total	1,297	8	0,162			

Tabela 22 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta rendimento actividade anti-oxidante FRAP % $\text{mmol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{casca}}$

Y_4	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor p	R^2 0,918
Modelo	402,180	4	100,545	27,80	<0,0001	
Erro	36,158	10	3,616			
Total ajustado	438,338	14	31,310			
Variáveis						
Intersecção	865,591	1	865,591	239,389	<0,0001	
Tempo (x_1)	41,223	1	41,223	11,401	0,0070	
Temperatura (x_2)	291,611	1	291,611	80,649	<0,0001	
Concentração Etanol (x_3)	1,037	1	1,037	0,287	0,6040	
x_1x_2	-	-	-	-	-	
x_1x_3	-	-	-	-	-	
x_2x_3	-	-	-	-	-	
x_1^2	-	-	-	-	-	
x_2^2	-	-	-	-	-	
x_3^2	68,309	1	68,309	18,892	0,0015	
Verificação Modelo						
Efeitos principais	333,871	3	111,290			
Efeitos de Interacção	-	-	-	-	-	
Efeitos Inter. e Quad.	-	-	-	-	-	
Efeitos quadráticos	68,309	1	68,309	18,892	0,0015	
Erro	36,158	10	3,616			
Falta de ajuste						
Falta de ajuste	34,592	8	4,324	5,522	0,1623	
Erro puro	1,566	2	0,783			
Erro total	36,158	10	3,616			

Tabela 23 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta selectividade de extracção de compostos fenólicos totais % $m_{EAG}/m_{extracto}$

Y_5	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor p	R^2 0,814
Modelo	707,706	7	101,101	4,366	0,0353	
Erro	162,112	7	23,159			
Total ajustado	869,818	14	62,130			
Variáveis						
Intersecção	$2,910 \times 10^{+3}$	1	$2,910 \times 10^3$	125,642	<0,0001	
Tempo (x_1)	38,369	1	38,369	1,657	0,2390	
Temperatura (x_2)	41,451	1	41,451	1,790	0,2228	
Concentração Etanol (x_3)	156,557	1	156,557	6,760	0,0354	
x_1x_2	119,355	1	119,355	5,154	0,0575	
x_1x_3	-	-	-	-	-	
x_2x_3	-	-	-	-	-	
x_1^2	25,475	1	25,475	1,100	0,3291	
x_2^2	162,017	1	162,017	6,996	0,0332	
x_3^2	206,264	1	206,264	8,907	0,0204	
Verificação Modelo						
Efeitos principais	236,376	3	78,792			
Efeitos de Interacção	119,356	1	119,356	5,154	0,0575	
Efeitos Inter. e Quad.	351,975	3	117,325	5,066	0,0356	
Efeitos quadráticos	351,975	3	117,325	5,066	0,0356	
Erro	162,112	7				
Falta de ajuste						
Falta de ajuste	155,540	5	31,108	9,468	0,0983	
Erro puro	6,571	2	3,286			
Erro total	162,112	7	23,159			

Tabela 24 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta selectividade de extracção de compostos com actividade anti-oxidante

 $mmol_{EAA}/g_{extracto}$

Y ₆ gAA / 100g extracto	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor p	R ² 0,842
Modelo	2,996x10⁺⁴	7	4,281x10⁺³	4,644	0,0302	
Erro	6,452x10⁺³	7	921,759			
Total ajustado	3,642x10⁺⁴	14	2,601x10⁺³			
Variáveis						
Intersecção	1,211x10 ⁺⁵	1	1,211x10 ⁺⁵	131,343	<0,0001	
Tempo (x ₁)	1,286x10 ⁺³	1	1,286x10 ⁺³	1,396	0,2760	
Temperatura (x ₂)	473,997	1	473,997	0,514	0,4965	
Concentração Etanol (x ₃)	6,950x10 ⁺³	1	6,950x10 ⁺³	7,540	0,0287	
x ₁ x ₂	5,114x10 ⁺³	1	5,114x10 ⁺³	5,548	0,0507	
x ₁ x ₃	-	-	-	-	-	
x ₂ x ₃	-	-	-	-	-	
x ₁ ²	683,106	1	683,106	0,741	0,4178	
x ₂ ²	8,879x10 ⁺³	1	8,879x10 ⁺³	9,633	0,0172	
x ₃ ²	8,320x10 ⁺³	1	8,320x10 ⁺³	9,026	0,0198	
Verificação Modelo						
Efeitos principais	8,711x10 ⁺³	3	2,904x10 ⁺³			
Efeitos de Interacção	5,114x10 ⁺³	1	5,114x10 ⁺³	5,548	0,0507	
Efeitos Inter. e Quad.	1,614x10 ⁺⁴	3	5,380x10 ⁺³	5,836	0,0256	
Efeitos quadráticos	1,614x10 ⁺⁴	3	5,380x10 ⁺³	5,836	0,0256	
Erro	6,452x10 ⁺³	7	921,759			
Falta de ajuste						
Falta de ajuste	6,105x10 ⁺³	5	1,221x10 ⁺³	7,035	0,1291	
Erro puro	347,118	2	173,559			
Erro total	6,452x10 ⁺³	7	921,759			

Tabela 25 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta selectividade de extracção de proantocianidinas % $m_{EEM}/m_{extracto}$

Y_7	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor p	R^2 0,842
Modelo	294,471	5	58,894	9,591	0,0021	
Erro	55,264	9	6,140			
Total ajustado	349,735	14	24,981			
Variáveis						
Intersecção	763,060	1	763,060	124,268	<0,0001	
Tempo (x_1)	1,722	1	1,722	0,280	0,6092	
Temperatura (x_2)	6,120	1	6,120	0,997	0,3442	
Concentração Etanol (x_3)	94,634	1	94,634	15,412	0,0035	
x_1x_2	-	-	-	-	-	
x_1x_3	-	-	-	-	-	
x_2x_3	-	-	-	-	-	
x_1^2	-	-	-	-	-	
x_2^2	76,924	1	76,924	12,527	0,0063	
x_3^2	128,282	1	128,282	20,891	0,0013	
Verificação Modelo						
Efeitos principais	102,477	3	34,159			
Efeitos de Interacção	-	-	-	-	-	
Efeitos Inter. e Quad.	-	-	-	-	-	
Efeitos quadráticos	191,995	2	95,997	15,634	0,0012	
Erro	55,264	9	6,140			
Falta de ajuste						
Falta de ajuste	52,228	7	7,461	4,915	0,1794	
Erro puro	3,036	2	1,518			
Erro total	55,264	9	6,140			

Tabela 26 Quadro resumo da análise de variância ANOVA obtida para o modelo quadrático da superfície de resposta rendimento de extracção de proantocianidinas % m_{EEM}/m_{casca}

Y_8 abs / 100mg extracto	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor p	R^2 0,849
Modelo	1,788	4	0,447	14,002	0,0004	
Erro	0,319	10	3,193x10⁻²			
Total ajustado	2,108	14	0,151			
Variáveis						
Intersecção	3,584	1	3,584	112,261	<0,0001	
Tempo (x_1)	0,105	1	0,105	3,299	0,0994	
Temperatura (x_2)	0,721	1	0,721	22,588	0,0008	
Concentração Etanol (x_3)	0,186	1	0,186	5,827	0,0364	
x_1x_2	-	-	-	-	-	
x_1x_3	-	-	-	-	-	
x_2x_3	-	-	-	-	-	
x_1^2	-	-	-	-	-	
x_2^2	-	-	-	-	-	
x_3^2	0,776	1	0,776	24,295	0,0006	
Verificação Modelo						
Efeitos principais	1,013	3	0,338			
Efeitos de Interacção	-	-	-	-	-	
Efeitos Inter. e Quad.	-	-	-	-	-	
Efeitos quadráticos	0,776	1	0,776	24,295	0,0006	
Erro	0,319	10				
Falta de ajuste						
Falta de ajuste	0,309	8	3,857x10 ⁻²	7,172	0,1281	
Erro puro	1,075x10 ⁻²	2	5,377x10 ⁻³			
Erro total	0,319	10	3,193x10 ⁻²			